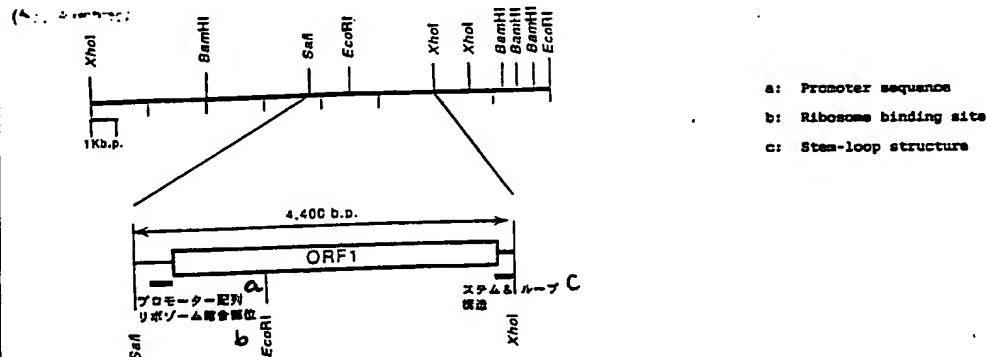




PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12P 13/08, 13/14, C12N 1/21, 15/53</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO95/34672</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1995年12月21日 (21.12.95)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> <b>PCT/JP95/01131</b> <b>(22) 国際出願日</b> <b>1995年6月7日 (07.06.95)</b>  <b>(30) 優先権データ</b> <b>特願平6/131744</b> <b>1994年6月14日 (14.06.94)</b> <b>JP</b>  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> <b>味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP]</b> <b>〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP)</b> <b>(72) 発明者：および</b> <b>(75) 発明者／出願人 (米国についてのみ)</b> <b>朝倉陽子(ASAKURA, Yoko)[JP/JP]</b> <b>木村英一郎(KIMURA, Eiichiro)[JP/JP]</b> <b>阿部知津(ABE, Chizu)[JP/JP]</b> <b>河原義雄(KAWAHARA, Yoshio)[JP/JP]</b> <b>中松 亘(NAKAMATSU, Tsuyoshi)[JP/JP]</b> <b>〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1</b> <b>味の素株式会社 生産技術研究所内 Kanagawa, (JP)</b> <b>白田佳弘(USUDA, Yoshihiro)[JP/JP]</b> <b>辻本信晴(TSUJIMOTO, Nobuharu)[JP/JP]</b>		<b>倉橋 修(KURAHASHI, Osamu)[JP/JP]</b> <b>〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1</b> <b>味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)</b> <b>(74) 代理人</b> <b>弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.)</b> <b>〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号</b> <b>ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</b>  <b>(81) 指定国</b> <b>BR, CN, JP, US, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR,</b> <b>GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>添付公開書類</b> <b>国際調査報告書</b>

**(54) Title :  $\alpha$ -KETOGLUTARIC DEHYDROGENASE GENE****(54) 発明の名称  $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子****(57) Abstract**

A coryneform L-glutamate producing bacterium deficient in  $\alpha$ -ketoglutaric dehydrogenase activity; a process for producing L-glutamic acid by using the bacterium; a gene coding for an enzyme having an  $\alpha$ -KGDH activity originating in the coryneform L-glutamate producing bacterium; a recombinant DNA containing the above gene; a coryneform bacterium holding the above DNA; and a process for producing L-lysine by using an L-lysine producing bacterium holding the recombinant DNA.

(57) 要約

$\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を欠損したコリネ型L-グルタミン酸生産菌、この細菌を用いたL-グルタミン酸の製造法、及びコリネ型L-グルタミン酸生産菌に由来する $\alpha$ -KGDH活性を有する酵素をコードする遺伝子、この遺伝子を含む組換えDNA、この組換えDNAを保持するコリネ型細菌、及び前記組換えDNAを保持し、L-リジン生産能を有する細菌を用いたL-リジンの製造法を開示する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DE	ドイツ	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	EE	エストニア	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LT	リトアニア	SD	スーダン
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	MC	モナコ	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MD	モルドバ	SK	スロバキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	TR	トルコ
CH	スイス	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	US	米国
CO	コロンビア	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ						

- 1 -

## 明細書

 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子

## 技術分野

本発明は、L-グルタミン酸及びL-リジンの発酵生産に用いられるコリネ型細菌の育種と利用に関する。更に詳しくは、本発明は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ ( $\alpha$ -KGDH) 活性が欠失したコリネ型L-グルタミン酸生産菌、該菌を用いたL-グルタミン酸の製造法、コリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH活性を有する酵素をコードする遺伝子 ( $\alpha$ -KGDH遺伝子)、該遺伝子を含む組換えDNA、該組換えDNAを保有するコリネ型細菌、及び該組換えDNAを保有し、L-リジン生産能を有するコリネ型細菌を用いたL-リジンの製造法に関する。

## 背景技術

従来よりL-グルタミン酸はブレバクテリウム属又はコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いた発酵法により工業的に生産されている。

近年、 $\alpha$ -KGDH活性が欠損もしくは低下し、かつL-グルタミン酸分解活性が低下した大腸菌変異株が、高いL-グルタミン酸生産能を持つことが明らかとなった（特開平5-244970公報）。

これに対し、ブレバクテリウム属の細菌においては、 $\alpha$ -KGDH活性の低下した変異株のL-グルタミン酸生産能は親株とほぼ同じであったとの報告があり（Agric. Biol. Chem., 44, 1897 (1980)、Agric. Biol. Chem., 46, 493 (1982)）、コリネ型細菌では、 $\alpha$ -KGDH活性のレベルはL-グルタミン酸の生産に重要ではないものと考えられていた。

一方、 $\alpha$ -KGDH活性が低下し、かつL-グルタミン酸生産能を有する変異株をビオチン過剰原料を炭素源とする培地中で培養すると、ペニシリン類や界面活性剤等のビオチン作用抑制物質を培地に添加することなく、高収率でL-グルタミン酸が生産されることが見い出されている（最大収率53%）（特開平6-

23779号公報)。しかしながら、上述したようにコリネ型細菌では、 $\alpha$ -KGDH活性のレベルはL-グルタミン酸の生産に重要ではないものと考えられていたため、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の $\alpha$ -KGDH遺伝子をクローニングし解析した例はなかった。また、 $\alpha$ -KGDHを欠失したコリネホルム細菌の変異株も知られていなかった。

### 発明の開示

本発明の目的は、コリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子を取得し、該遺伝子を含む組換えDNAを作製し、該組換えDNAで形質転換した微生物を用いて $\alpha$ -KGDH活性のレベルがL-グルタミン酸の発酵生産に及ぼす影響を明らかにし、もってコリネ型L-グルタミン酸生産菌の育種において新たな方法論を提供することにある。より具体的には、本発明の目的は、染色体上に存在する $\alpha$ -KGDH遺伝子を破壊することにより $\alpha$ -KGDH活性を欠失させたコリネ型L-グルタミン酸生産菌を取得し、該菌を用いたL-グルタミン酸の製造法を提供することにある。また、本発明は、 $\alpha$ -KGDH遺伝子を含む組換えDNAを保有するコリネ型細菌、及び該組換えDNAを保有し、L-リジン生産能を有するコリネ型細菌を用いたL-リジンの製造法を提供することにある。

本発明者らは、コリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子を取得しその構造を明らかにするとともに、該遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミドでコリネ型L-グルタミン酸生産菌を形質転換し、得られた形質転換体の $\alpha$ -KGDH活性のレベルとL-グルタミン酸の生産能を調べた結果、 $\alpha$ -KGDH活性がL-グルタミン酸の生産に顕著な影響を及ぼすことを見いだした。また、本発明者らは、コリネ型L-グルタミン酸生産菌において染色体上に存在する $\alpha$ -KGDH遺伝子を破壊することにより $\alpha$ -KGDH活性を欠失させた株が、過剰量のビオチンを含有する培地に培養する際、界面活性剤やペニシリンのようなビオチン作用抑制物質を培地に添加することなく著量のL-グルタミン酸を生成蓄積することを見いだした。更に、本発明者らは、 $\alpha$ -KGDH遺伝子を含む組換えDNAをL-リジン生産能を有するコリネ型細菌に導入した結果、得られた

組換え体のＬ－リジン生産能が顕著に向上することを見だし、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1)染色体上に存在する $\alpha$ -KGDH活性を有する酵素をコードする遺伝子又はそのプロモーターの塩基配列中に1又は2以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位が生じたことにより、 $\alpha$ -KGDH活性が欠損したコリネ型Ｌ－グルタミン酸生産菌、
  - (2)上記(1)記載のコリネ型Ｌ－グルタミン酸生産菌を液体培地中に培養し、培養液中にＬ－グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするＬ－グルタミン酸の製造法、
  - (3)コリネ型Ｌ－グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子、
  - (4)コリネ型Ｌ－グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターが連結されて得られる組換えDNA、
  - (5)上記(4)記載の組換えDNAを保有するコリネ型細菌、及び
  - (6)上記(5)記載の組換えDNAを保有し、かつＬ－リジン生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にＬ－リジンを生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするＬ－リジンの製造法、
- を提供するものである。

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明でいうコリネ型Ｌ－グルタミン酸生産菌とは、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型Ｌ－グルタミン酸生産菌の例として以下のものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

- 4 -

コリネバクテリウム・メラセコーラ

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・ロゼウム

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC 13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC 15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC 15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13020

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC 17965

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14020

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 14067

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC 14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメントム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC 13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC 13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC 14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC 19240

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ 12340 (FERM BP

- 1 5 3 9 )

本発明の $\alpha$ -KGDH遺伝子は、上記のようなコリネ型L-グルタミン酸生産菌の野生株又はこれらから誘導される変異株の染色体DNAから、以下のようにして得ることができる。

大腸菌の $\alpha$ -KGDH複合体は、E 1 ( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase : EC 1.2.4.2)、E 2 (dihydrolipoamide succinyltransferase : EC 2.3.1.61)、E 3 (lipoamide dehydrogenase : 1.6.4.3) の3つのサブユニットで構成され、E 1、E 2 遺伝子はオペロン構造を成し、E 3 はピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase : EC 1.2.4.1) と共有していることが知られている。大腸菌の E 1、E 2 遺伝子のヌクレオチド配列は明らかにされている (Eur. J. Biochem., 141, 351 (1984)、Eur. J. Biochem., 141, 361 (1984))。

また、枯草菌についても同様に、E 1、E 2 遺伝子のヌクレオチド配列が明らかにされている (J. Bacteriol., 171, 3667 (1989)、Gene, 61, 217 (1987)等)。

そこで、大腸菌と枯草菌の E 1 遺伝子の塩基配列との相同性を利用して、コリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子の単離及びクローン化に本発明者らは成功した。その工程は以下の通りである。

まず、大腸菌と枯草菌の $\alpha$ -KGDH・E 1 サブユニット遺伝子間で相同性の高い領域を選び両端の配列からプライマーを合成する。プライマーとしては、塩基組成がランダムでG+C含量が50%付近であり、特殊な2次構造を形成せず、互いに相補的でない、との条件を満たすものであればどのような配列でもよい。長さは通常20ないし30塩基のものがよく用いられる。具体的に例示すると、配列表配列番号3及び4に示すようなものが挙げられる。

ついで、本プライマーと枯草菌染色体DNAからポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 (PCR法) により枯草菌 $\alpha$ -KGDH遺伝子の一部分から成るプローブを作成する。プローブとしては、20塩基程度以上の長さであれば用いることが可能であるが、100塩基程度以上の長さのものであることが望ましい。また、プローブの塩基配列は、目的とする遺伝子の配列と相補的であることが望ましいが、高い相同性を有しているものであれば用いることができる。

一方、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の染色体DNAを抽出し、制限酵素に

より消化して得られたDNA断片をベクターに連結して組換え体DNAを作成し、該組換え体DNAで大腸菌を形質転換する。制限酵素としては、例えば、BamHI、EcoRI、XhoI等が用いられ、また、ベクターとしては大腸菌由来のベクター、例えば、pUC19、pBR322等が用いられる。作成した組換え体DNAの受容菌としては、ベクターの複製に好適なものであればいずれの菌株でもよく、例えばHB101、JM109、DH5等の大腸菌菌株が用いられる。

かくして得られる形質転換体の中からコロニー・ハイブリダイゼーションによりプローブDNAとハイブリダイズする株を選択し、当該形質転換体より組換え体DNAを回収し、ベクターに連結されているコリネ型L-グルタミン酸生産菌染色体DNAの制限酵素断片の構造を解析する。

得られたDNA断片は、必ずしも目的とする酵素をコードする遺伝子の全長を含んでいるとは限らない。この場合、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の染色体DNAを別の制限酵素で切断し、ベクターに連結して組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAにより形質転換を行い、上記と同様にコロニー・ハイブリダイゼーションによる選択と制限酵素断片の解析を行うことにより $\alpha$ -KGDH遺伝子の全長を含むDNA断片を取得することができる。この時、プローブとして初めに取得したDNA断片を用いることにより、コロニーハイブリダイゼーションをより容易に行うことができる。

$\alpha$ -KGDH遺伝子を含むDNA断片は、他の適当なベクターに再度組換えてコリネ型L-グルタミン酸生産菌に導入することができる。用いられるベクターは、例えばコリネバクテリウム属細菌で自律複製できるプラスミドである。具体的に例示すれば、pAM330（特開昭58-67699号公報）、pHM1519（特開昭58-77895号公報）、pAJ655、pAJ611、pAJ1844（以上、特開昭58-192900号公報）、pCG1（特開昭57-134500号公報）、pCG2（特開昭58-35197号公報）、pCG4、pCG11（特開昭57-183799号公報）、pHK4（特開平5-7491号公報）等が挙げられる。

上記ベクターと、コリネ型L-グルタミン酸生産菌の $\alpha$ -KGDH遺伝子とを



連結して組換え体DNAを調製するには、あらかじめ制限酵素を用いてベクターを切断する。染色体DNAを切断するときに用いる制限酵素と同じものにより切断し、又は染色体DNA断片の切断面に相補する切断面を生じる制限酵素を用いて切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

各種組換えDNAを受容菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行う。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))があり、枯草菌について報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(C. H. Gene, 1, 153 (1977))がある。あるいは、枯草菌、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラスト又はスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979)、Nature, 274, 398 (1978)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))も応用できる。

プロトプラスト法では上記の枯草菌において使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができるが、特開昭57-183799号公報に開示されるように、コリネバクテリウム属細菌細胞のプロトプラストをポリエチレングリコール又はポリビニルアルコールの一方及び二価金属イオンに接触させた状態でDNAをとり込ませる方法も利用できる。ポリエチレングリコール又はポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社製)などの添加によってもDNAのとり込みを促進させることができる。本発明の実施例で用いた形質転換の方法は、電気パルス法(特開平2-207791号公報参照)である。

このようにして得たコリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子を含む組換え体DNAを導入した菌株は、炭素源、窒素源、無機塩類、さらに必要に応じて有機微量栄養素を含有する通常の培地に培養することにより $\alpha$ -KGDH活性を有する酵素を高レベルで菌体内に生成させることができる。

炭素源としては、グルコース、シュクロース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物などの

糖類の他、酢酸、クエン酸などの有機酸類、エタノールなどのアルコール類が使用され、窒素源としては、尿素、アンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガスなどが使用される。無機塩類としては、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩、鉄塩、マンガン塩などが使用される。有機微量栄養素としては、アミノ酸類、ビタミン類、脂肪酸類、核酸類、その他これらのものを含有するペプトン、酵母エキス、大豆蛋白加水分解物などが使用される。

培養は、温度 25 ないし 37℃ にて pH を 5 ないし 9 に制御しつつ、10 ないし 40 時間好氣的条件下にて行う。

培養終了後、培養液中に生成蓄積した L-グルタミン酸を定量するとともに、菌体の  $\alpha$ -KGDH 活性のレベルを測定する。活性測定は、遠心分離などの操作により培養物から回収した菌体を、超音波処理、フレンチプレス処理などにより破碎した後遠心分離して菌体残渣を除去し、ゲル濾過にて低分子物質を除いたものを用いて、Agric. Biol. Chem., 44, 1897 (1980) 記載の方法等により行うことができる。

かくして遺伝子が増幅されたコリネ型 L-グルタミン酸生産菌と増幅されていない菌について、 $\alpha$ -KGDH 活性のレベルと L-グルタミン酸の生産能の関係を調べた結果、後述の参考例 1 に示すとおり、遺伝子が増幅により  $\alpha$ -KGDH 活性のレベルが上昇した菌では L-グルタミン酸生産能が低下していることが明らかとなった。

本遺伝子の利用としては、薬剤遺伝子の挿入等による  $\alpha$ -KGDH 活性欠失株の取得、*in vitro* 変異による活性弱化株の取得、プロモーターの改変による発現低下株の取得等により、従来のコリネ型 L-グルタミン酸生産菌と比較してさらに L-グルタミン酸生産能が向上した菌株を効率よく育種することが可能となる。

$\alpha$ -KGDH 活性が欠失した株の取得は、化学薬剤を用いて変異を誘導する方法でも、遺伝子組換えによる方法でも取得可能である。しかし、化学薬剤による変異誘導法では  $\alpha$ -KGDH 活性が低下した株を得ることは比較的容易であるが該活性が完全に欠失した株の取得は困難であり、このような株を取得するには上記のようにして明らかとなった  $\alpha$ -KGDH 遺伝子の構造を基に、遺伝子相同組換え法により染色体上に存在する  $\alpha$ -KGDH 遺伝子を改変又は破壊する方法が

有利である。相同組換えによる遺伝子破壊は既に確立しており直鎖DNAを用いる方法や温度感受性プラスミドを用いる方法などが利用できる。

具体的には、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., *Methods in Enzymology*, 154, 350 (1987)) や次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤による処理 (Shortle, D. and Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 270 (1978)) によって、 $\alpha$ -KGDH遺伝子のコーディング領域又はプロモーター領域の塩基配列の中に1つ又は複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を起こさせ、このようにして改変又は破壊した遺伝子を染色体上の正常な遺伝子と置換することにより遺伝子産物である $\alpha$ -KGDHの活性を欠失させるか $\alpha$ -KGDH遺伝子の転写を消失させることができる。

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対だけに、任意の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、DNA塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて一本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、この時合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つようにしておく。この後一本鎖DNAと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントとT4リガーゼを用いて完全な2本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加又は逆位が固定された遺伝子を含むプラスミドを持っている。遺伝子の変異を導入し、改変又は破壊することができる同様な手法には、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton press (1989)) がある。

また、化学薬剤処理を用いる方法は、目的の遺伝子を含むDNA断片を直接次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等で処理することによりDNA断片中にランダムに塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つ変異を導入する方法である。

このようにして取得した変異が導入されて改変又は破壊された遺伝子をコリネ

型L-グルタミン酸生産菌の染色体上の正常な遺伝子と置換する方法としては、相同性組換えを利用した方法 (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory press (1972); Matsuyama, S. and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)) がある。相同性組換えは、染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体を染色体上に組み込む。この後さらに染色体上の相同性を有する配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により変異が導入された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位を持つ変異が導入されて改変又は破壊された遺伝子が染色体上の正常な遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

かくして得られる $\alpha$ -KGDH活性が欠失したコリネ型L-グルタミン酸生産菌は、 $\alpha$ -KGDH活性が部分的に低下した株に比べて特に過剰量のビオチンを含有する培地においてL-グルタミン酸生産能が顕著に優れている。

$\alpha$ -KGDH活性が欠失したコリネ型L-グルタミン酸生産菌を用いてL-グルタミン酸を生成蓄積させるには、炭素源、窒素源、無機イオン及びその他の栄養素を含有する液体培地に培養する。従来、ビオチンを過剰に含む液体培地中に培養を行う場合にはビオチン作用抑制物質、すなわちペニシリンG、F、K、O、V、X等のペニシリン類又はシュークロースモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート等の高級脂肪酸もしくはその誘導体より成る界面活性剤を培地に添加することがL-グルタミン酸を高収率で生産するために必要であったが、 $\alpha$ -KGDH活性が欠失した本発明のコリネ型L-グルタミン酸生産菌を使用する場合、10乃至1000 $\mu$ g/lの高濃度のビオチンを含む液体栄養培地で培養する際においても上記のようなビオチン作用抑制物質の添加を行うことなく高収率、高蓄積でL-グルタミン酸を生成蓄積させることができる。

即ち、炭素源としては、グルコース、フラクトース、澱粉糖化液、酢酸等の他、甘藷、甜菜からの糖汁あるいは廃糖蜜等のビオチンを過剰に含有する原料も使用

することができる。窒素源としては、通常のL-グルタミン酸発酵に用いられるアンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガス、尿素等が用いられ、その他リン酸塩、マグネシウム塩等の無機イオンが必要に応じて適宜使用される。また、必要により、サイアミン等の微量栄養素が適宜培地に添加される。

培養は好氣的条件下で行うのがよく、培養温度24～42℃、培養中pHは5～9に制御するのがよく、pHの調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、さらには尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス等を使用することができる。

培養液からのL-グルタミン酸を採取する方法は、イオン交換樹脂処理、晶析等公知の方法を適宜組み合わせることにより行われる。

なお、L-グルタミン酸生産性を向上させるには、グルタミン酸生合成系遺伝子を強化することが有利である。グルタミン酸生合成系遺伝子を強化した例としては、解糖系のホスホフルクトキナーゼ（PFK、特開昭63-102692号）、アナプレロティック経路のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC、特開昭60-87788号、特開昭62-55089号）、TCA回路のクエン酸合成酵素（CS、特開昭62-201585号、特開昭63-119688号）、アコニット酸ヒドラターゼ（ACO、特開昭62-294086号）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（ICDH、特開昭62-166890号、特開昭63-214189号）、アミノ化反応としてはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH、特開昭61-268185号）等がある。

上記の遺伝子を取得するためには以下に示す様な方法が考えられる。

- (1) 目的遺伝子に変異が起こり特徴的な形質を示す変異株で、目的遺伝子を導入することによりその形質が消失するような変異株を取得し、その変異株の形質を相補するような遺伝子をコリネ型細菌の染色体から取得する方法。
- (2) 目的遺伝子が他の生物において既に取得され塩基配列が明らかになっている場合、相同性の高い領域のDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションの手法により目的の遺伝子を取得する方法。
- (3) 目的遺伝子の塩基配列がかなり詳細に判明している場合は目的遺伝子を含む遺伝子断片をコリネ型細菌の染色体を鋳型としPCR法（ポリメラーゼ・チェーン

・リアクション法)により取得する方法。

ここで用いる染色体の取得方法は上記の方法を用いることができる。また、宿主-ベクター系としては、コリネ型細菌で利用可能なものであればよく、上記で述べたものが用いられる。本発明の実施例においては塩基配列が既に明らかになっている場合に有効である上記(3)の方法を用いた。

また、上記(2)及び(3)の方法で遺伝子を取得する場合、目的遺伝子が独自のプロモーターを持たない時にはコリネ型細菌でプロモーター活性を持つDNA断片を目的遺伝子上流に挿入することにより目的遺伝子を発現させることができる。目的遺伝子の発現を強化するには、強力なプロモーターの下流に目的遺伝子を連結することが考えられる。コリネ型細菌の細胞内で機能するプロモーターのうち強力なものとしては、大腸菌の *lac* プロモーター、*tac* プロモーター、*trp* プロモーター等がある (Y. Morinaga, M. Tsuchiya, K. Miwa and K. Sano, J. Biotech. 5, 305-312(1987))。また、コリネバクテリウム属細菌の *trp* プロモーターも好適なプロモーターである (特開昭 62-195294 号公報)。本発明の実施例においては、PEPC 遺伝子の発現にコリネ型細菌の *trp* プロモーターを用いた。

また、本発明の  $\alpha$ -KGDH 遺伝子の増幅は、L-リジン生産能を有するコリネ型細菌において、その生産能を向上させる上で有用である。

従来より種々の人工変異株が L-リジン生産菌として用いられており、これらを宿主として本発明の組換え DNA を保有させることによりその L-リジン生産能を向上させることができる。このような人工変異株としては次のようなものがある。S-(2-アミノエチル)-システイン (以下、「AEC」と略記する) 耐性変異株、その生育に L-ホモセリンのようなアミノ酸を必要とする変異株 (特公昭 48-28078 号、特公昭 56-6499 号)、AEC に耐性を示し、更に L-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株 (米国特許第 3708395 号及び第 3825472 号)、DL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム、 $\alpha$ -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸アナログ、サルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示す L-リジン生産変異株、オキザロ酢酸

脱炭酸酵素または呼吸系酵素阻害剤に耐性を示すL-リジン生産変異株（特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号）、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、フルオロピルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株（特開昭55-9783号、特開昭53-86090号）、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するブレビバクテリウムまたはコリネバクテリウムの変異株（米国特許第4411997号参照）等。

具体的には、以下のような株を例示することができる。

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12031 (FERM-BP277、特開昭60-62994号公報)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC39134 (特開昭60-62994号公報)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3463 (FERM-P1987、特公昭51-34477号公報)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12435 (FERM BP-2294、米国特許第5,304,476号)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12592 (FERM BP-3239、米国特許第5,304,476号)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12596 (FERM BP-3242、米国特許第5,304,476号)

このようなL-リジン生産菌に $\alpha$ -KGDH遺伝子を導入するには、既に述べたように適当なベクターと連結して行えばよい。

使用するL-リジン生産用の培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースや澱粉加水分解物などの糖類、エタノールやイノシトールなどのアルコール類、酢酸、フマル酸、クエン

酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB<sub>1</sub>などの要求物質または酵母エキスを必要に応じ適量含有させることが望ましい。

培養は好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～8.5に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのL-リジンの採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、 $\alpha$ -KGDH遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。なお、制限酵素は市販品（宝酒造社製）を用いた。

#### 実施例1 $\alpha$ -KGDH遺伝子の単離及び構造決定

##### (1) プロープの調製

大腸菌と枯草菌の $\alpha$ -KGDH・E1サブユニット遺伝子間で相同性の高い領域を選び、配列表配列番号3及び4に示すオリゴヌクレオチドをホスホアミダイド法によりDNA合成装置（アプライドバイオシステム社製モデル394）を用いて合成した。

プライマーとして該オリゴヌクレオチド0.25  $\mu$ mol e、鋳型として常法によって調製したバチルス・ズブチリス NA64（同株はバチルス・ジェネテ



イック・ストック・センター（米国オハイオ州立大学）より入手した）の染色体DNA 0.1  $\mu$ g 及びタックDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）2.5ユニットをdATP、dCTP、dGTP、dTTP各200  $\mu$ M、塩化カリウム50 mM、塩化マグネシウム1.5 mM及びゼラチン0.0001%を含有する10 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.3）0.1 mlに添加し、94℃を1分、55℃を2分、72℃を3分のサイクルを30回繰り返すPCR法を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的とするDNA断片をグラスパウダー（宝酒造社製）を用いて回収した。このDNA断片をクレノウフラグメント（アマシヤム社製）と[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP（アマシヤム社製）を用いたラベル化の常法に従って標識し、プローブとして用いた。

（2）プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869の染色体DNA断片の調製

バクト・トリプトン（ディフコ社製）1%、バクト・イーストエキストラクト（ディフコ社製）0.5%及び塩化ナトリウム0.5%から成るT-Y培地（pH 7.2）500 mlに、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869を接種し、31.5℃で6時間培養し培養物を得た。この培養物を5,000 rpmで10分間遠心分離処理し沈澱物として湿菌体2 gを得た。

該菌体から齊藤、三浦の方法（Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963)）により染色体DNAを抽出した。この染色体DNA 2  $\mu$ g 及び制限酵素EcoRI 200ユニットを10 mM塩化マグネシウム、100 mM塩化ナトリウム及び1 mMジチオスレイトールを含有する50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.5）におおの混合し、温度37℃で15時間反応させた。反応終了液を常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理してEcoRIで消化されたプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869の染色体DNA断片を得た。

（3）プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869の $\alpha$ -KGDH遺伝子の単離

プラスミドベクターpUC18（宝酒造社製）1  $\mu$ g 及び制限酵素EcoRI

20 ユニットを 10 mM 塩化マグネシウム、100 mM 塩化ナトリウム及び 1 mM ジチオスレイトールを含有する 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に混合し、温度 37℃ で 2 時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この後、プラスミドベクター由来の DNA 断片が再結合するのを防止するため、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl. 60 (1989)) の方法でバクテリアル・アルカリフォスファターゼ処理により DNA 断片の脱リン酸化を行い、常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。

この EcoRI で消化された pUC18 を 0.1 µg、(2) で得られた EcoRI で消化されたブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の染色体 DNA 断片 1 µg 及び T4 DNA リガーゼ 1 ユニット (宝酒造社製) を 6.6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール及び 10 mM アデノシン三リン酸を含有する 66 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度 16℃ で 8 時間反応し、DNA を連結させた。次いで該 DNA 混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、これを 100 µg/ml のアンピシリンを含む L 寒天培地上にまき、約 10,000 個の形質転換体を得た。

得られた形質転換体から、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl. 90 (1989)) の方法により、(1) で得られたプローブ DNA とハイブリダイズする形質転換体を選択した。

(4) ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の α-KGDH 遺伝子の塩基配列の決定

(3) により得られた形質転換体から Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, pl. 25 (1989)) 記載のアルカリ溶菌法によりプラスミド DNA を調製した。該プラスミド DNA はブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 1

- 17 -

3869の染色体DNA由来の約6キロベースのDNA断片を含んでいた。該プラスミドを(3)の反応組成で制限酵素EcoRI及びXhoIで切断し、常法に従いアガロースゲル電気泳動を行い(3)と同様にしてサザンハイブリダイゼーションを行いプローブDNAとハイブリダイズする断片を同定した。その結果、EcoRI及びXhoIに切断された約3キロベースの切断断片がハイブリダイズすることが判明した。該DNA断片を(3)で行ったようにEcoRI及びXhoIで切断したプラスミドベクターpHSG397(宝酒造社製)に連結しクローン化した。得られたプラスミドDNAを用いて該DNA断片の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオケミカル社製)を用いSangerの方法(J. Mol. Biol., 143, 161 (1980))に従って行った。

得られたDNA断片は完全なオープン・リーディング・フレームを含んでいなかったため、(3)で行ったようにブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム

ATCC13869の染色体DNAをXhoIで切断しpHSG397に連結した組換え体プラスミドで形質転換を行い、(2)で得られたブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869の染色体DNA由来の約3キロベースのEcoRI、XhoI切断断片を(1)の方法に従いラベル化したものをプローブとしてハイブリダイズする形質転換体を選択した。得られた形質転換体の有するプラスミドは約9キロベースのDNA断片を含んでいた。このDNA断片を含む遺伝子の制限酵素地図を図1に示した。該プラスミドを(3)の反応組成で制限酵素SalI及びXhoIで切断し、常法に従いアガロースゲル電気泳動を行い(3)の方法によりハイブリダイズする断片を同定した結果、約4.4キロベースの断片であることが判明した。該DNA断片を(3)で行ったようにSalI及びXhoIで切断したプラスミドベクターpHSG397に連結しクローン化した。このプラスミドをpHSGS-Xと命名した。該プラスミドが含むSalI及びXhoI切断断片中SalI切断点からEcoRI切断点までの約1.4キロベースのDNA断片の塩基配列の決定を上記と同様にして行った。

こうして得られたSalI及びXhoI切断遺伝子断片の塩基配列は配列表配列番号1に示す通りである。オープン・リーディング・フレームを推定し、その

塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列表配列番号 1 及び配列番号 2 に示した。すなわち、配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質をコードする遺伝子が、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869 の  $\alpha$ -KGDH 遺伝子である。なお、蛋白質の N 末端にあるメチオニン残基は開始コドンである ATG に由来するため蛋白質本来の機能とは無関係であることが多く、翻訳後ペプチダーゼの働きにより除去されることがよく知られており、上記蛋白質の場合にもメチオニン残基の除去が生じている可能性がある。

塩基配列、アミノ酸配列おのおのについて既知の配列との相同性比較を行った。用いたデータベースは EMBL 及び SWISS-PROT である。その結果、配列表配列番号 1 に示される DNA 及びそれにコードされる蛋白質は、既に報告済みの大腸菌及び枯草菌の  $\alpha$ -KGDH・E1 サブユニット遺伝子等と相同性を持つコリネ型細菌では新規な遺伝子及び蛋白質であることが判明した。

本遺伝子のコードする蛋白質は、N 末端のメチオニン残基を含めて 1, 257 個のアミノ酸から成り、既に報告のある  $\alpha$ -KGDH とは大きく異なる特徴を有していた。すなわち、C 末端側の約 900 アミノ酸は種々の E1 サブユニットと高い相同性を示したが、N 末端側の 300 アミノ酸は他種  $\alpha$ -KGDH には見られないものであり、本蛋白質が特殊な機能を持つことを示唆するものである。この N 末端側 300 アミノ酸部分を既知の配列との相同性比較を行うと大腸菌やアゾトバクター属細菌の E2 サブユニットとの相同性が認められた。これは、本蛋白質が他種  $\alpha$ -KGDH とは異なり、E1、E2 両方の活性を持つ可能性を示唆するものである。

また、本遺伝子オープン・リーディング・フレーム上流には大腸菌に見られるプロモーター共通配列に類似した配列 (281-286 及び 307-312) 及びコリネ型細菌のリボゾーム結合配列と類似した配列 (422-428) が見いだされた。本遺伝子オープン・リーディング・フレーム下流には、転写の終結シグナルと類似したステム & ループ構造 (4243-4281) がみられた。これらの配列は本遺伝子が独立して転写、翻訳を受けており、他種  $\alpha$ -KGDH とは異なった遺伝子構造を持っていることを示唆するものである。

実施例2 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869由来の $\alpha$ -KGDH遺伝子の発現による $\alpha$ -KGDH活性の増幅

(1)  $\alpha$ -KGDH遺伝子のプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869及びAJ11060への導入

実施例1で得られたpHSGS-XプラスミドDNA1 $\mu$ g、制限酵素Sa1I及びXhoIそれぞれ20ユニットを実施例1(3)に記載した緩衝液中で混合し、温度37℃で3時間反応した。一方、プレバクテリウム属細菌内で自律複製可能なプラスミドpPK4(特開平5-7491号公報参照)DNA1 $\mu$ gと20ユニットのSa1Iを実施例1(3)に記載した緩衝液中で混合し、温度37℃で3時間反応した。両反応液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱した。この後、プラスミドベクター由来のDNA断片が再結合するのを防止するため、実施例1(3)の方法でバクテリアル・アルカリフォスファターゼ処理によりDNA断片の脱リン酸化を行い、常法によりフェノール抽出処理し、エタノール沈澱を行なった。このSa1Iで消化されたpPK4を0.1 $\mu$ g、上記で得られたSa1I及びXhoIで消化されたpHSGS-XプラスミドDNA0.5 $\mu$ g及びT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)1ユニットを実施例1(3)に記載の緩衝液中で混合し、温度16℃で8時間反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物を電気パルス法を用いた形質転換の常法(特開平2-207791号公報)に従い、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11060(特公昭59-10797号公報)に導入した。これをポリペプトン1%、酵母エキス1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.5%及びカナマイシン25 $\mu$ g/mlから成る寒天培地上にまき、形質転換体AJ11060/pPKS-Xを得た。本形質転換体は、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12999と命名され、平成6年6月3日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14349で寄託され、平成7年6月2日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5123が付与されている。

得られた形質転換体から実施例1(4)に従ってプラスミドDNAを抽出し、

常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行うことにより、プラスミド pPK4 に  
ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 由来の Sa l  
I - X h o I 断片が結合した組換え体 DNA を選択した。該プラスミドを pPK  
S-X と命名した。

また、同様にしてブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13  
869 を宿主として形質転換体 ATCC13869/pPKS-X を取得した。

## (2) $\alpha$ -KGDH 遺伝子増幅株の酵素活性

(1) で得られたブレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ1106  
0/pPKS-X 及び ATCC13869/pPKS-X をグルコース 8%、リ  
ン酸 2 水素カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.004%、硫酸アンモニウ  
ム 3%、硫酸第一鉄 0.001%、硫酸マンガン 0.001%、大豆加水分解液  
0.05%、ビタミン B<sub>1</sub> 200  $\mu$ g/l、ビオチン 300  $\mu$ g/l、炭酸カルシ  
ウム 5% 及びカナマイシン 25 mg/l から成る培地 (pH 8.0) 50 ml に  
接種し、31.5℃で18時間培養した。該培養液を常法に従って遠心分離し、  
菌体を集めた。

この菌体を 0.2% 塩化カリウム水溶液で懸濁し、遠心分離する操作を 2 回繰  
り返し菌体を洗浄した。該菌体を 30% グリセロールを含む N-トリス (ヒドロ  
キシメチル) メチルー 2-アミノエタンスルホン酸 (以下 TES) 0.1 M 緩  
衝液 (pH 7.7) に懸濁し、超音波処理した後、15,000 rpm、30 分  
遠心分離して上清を得た。この細胞破碎液をセファデクス G-25 (Pharmacia 社  
製) カラムクロマトグラフィーに供し、低分子量物質を除いたものを粗酵素液と  
した。

得られた粗酵素液の  $\alpha$ -KGDH 活性を Agric. Biol. Chem., 44. 1897 (1980)  
記載の反応組成液を用いて 3-アセチルピリジン・アデニン・ジヌクレオチドの  
365 nm の吸光度の上昇を測定した。また、粗酵素液の蛋白質濃度はウシ血清  
アルブミンを標準としてバイオ・ラッド社製キットを用いて測定し、酵素の比活  
性を算出した。対照として、プラスミド pPK4 で同様に形質転換して得た AJ  
11060/pPK4 及び ATCC13869/pPK4 の比活性を求めた。そ

の結果を表1に示した。AJ11060/pPKS-XとATCC13869/pPKS-XはそれぞれAJ11060/pPK4とATCC13869/pPK4の2倍もしくはそれ以上の比活性を有しており、この結果から取得した遺伝子断片が $\alpha$ -KGDH活性を有する酵素をコードしていることが示された。

表1

菌 株	$\alpha$ -KGDH比活性 ( $\Delta$ Abs/min/mg protein)
AJ11060/pPK4	0.029
AJ11060/pPKS-X	0.055
ATCC13689/pPK4	0.019
ATCC13869/pPKS-X	0.060

また、粗酵素液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した結果、取得された遺伝子から予想される酵素の分子量139キロダルトンに見合った約135キロダルトンのバンドの増幅が観察された。これは取得した遺伝子が形質転換株において実際に発現していることを示すものである。

#### 参考例1 $\alpha$ -KGDH活性とL-グルタミン酸生産能との関係

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ11060/pPK4及びAJ11060/pPKS-XをL-グルタミン酸生産培地に培養し、培養液中に生成蓄積したL-グルタミン酸を測定した。培養は界面活性剤を添加する方法で以下の様に行った。

グルコース8%、リン酸2水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.04%、硫酸アンモニウム3%、硫酸第一鉄0.001%、硫酸マンガン0.001%、大豆加水分解液1.5%、サイアミン塩酸塩200 $\mu$ g/l、ビオチン300 $\mu$ g/l、カナマイシン25mg/l及びCaCO<sub>3</sub>(別殺菌)5%から成る生産培地(pH8.0)20mlを500ml容坂口フラスコに分注し加熱殺菌

- 22 -

した。これにあらかじめAJ11060/pPK4及びAJ11060/pPKS-Xのそれぞれをポリペプトン（日本製薬社製）1%、バクト・イーストエキストラクト（ディフコ社製）1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.5%及びカナマイシン25mg/lから成る平板培地（pH7.2）にて培養して得た菌体を接種し、31.5℃にて18時間振とう培養し、種培養を得た。

ついで、界面活性剤（Tween40：シグマ社製）を3g/l添加した生産培地又は添加していない生産培地に得られた種培養をそれぞれ5%量接種し、同様にして31.5℃にて約20時間振とう培養した。

培養終了後、培養液中のL-グルタミン酸蓄積量及び残グルコース濃度を旭化成社製バイオテックアナライザーAS-210を用いて測定した。菌体増殖量は、0.02規定塩酸で培養物を51倍希釈した液の620nmにおける吸光度を測定することにより求めた。その結果を表2に示す。

表2

菌 株	界面活性剤	増殖量 (OD)	残糖量 (g/dl)	蓄積量 (g/dl)	収率 (%)
AJ11060/pPK4	—	1.72	0.45	0	0
	+	0.78	1.80	2.46	42.4
AJ11060/pPKS-X	—	1.31	1.89	0	0
	+	0.78	3.69	0.37	9.4

いずれの菌株も界面活性剤を添加しない培地では、L-グルタミン酸の生成は全く認められず、界面活性剤を添加した場合のみグルタミン酸は培養液中に生成蓄積した。この際、 $\alpha$ -KGDH遺伝子を含むプラスミドpPKS-Xを導入した株では、対照となるpPK4導入株に対して著しいL-グルタミン酸収率の低下を起こした。このことは $\alpha$ -KGDH活性のレベルが界面活性剤添加によるL-グルタミン酸生産に大きな影響を及ぼすことを示すものである。



### 参考例2 ペニシリン添加法によるL-グルタミン酸生産能の比較

$\alpha$ -KGDH遺伝子増幅のL-グルタミン酸生成に及ぼす効果をペニシリン添加法により調べた。

参考例1と同様に種培養を調製し、0.4ユニット/mlのペニシリンを添加した生産培地又は添加しない生産培地に、菌体乾燥重量で約2%になる様に種培養をそれぞれ接種し、31.5℃にて約25時間振とう培養を行った。

培養終了後、培養液中のL-グルタミン酸蓄積量及び残グルコース濃度を参考例1と同様に測定した。結果を表3に示した。この結果は、 $\alpha$ -KGDH活性のレベルがペニシリン添加によるL-グルタミン酸生産においても大きな影響を及ぼすことを示すものである。

表3

菌 株	ペニシリン	増殖量 (OD)	残糖量 (g/dl)	蓄積量 (g/dl)	収率 (%)
AJ11060/pPK4	-	1.84	0.0	0	0
	+	0.72	0.0	3.90	49.1
AJ11060/pPKS-X	-	1.87	0.0	0	0
	+	1.07	0.0	2.39	30.1

### 実施例3 $\alpha$ -KGDH遺伝子欠損株の作製

$\alpha$ -KGDH遺伝子増幅によりL-グルタミン酸生成が抑制されたことから、逆に $\alpha$ -KGDH遺伝子を破壊する事によりグルタミン酸収率を向上させることが期待された。遺伝子破壊株は、特開平5-7491号に示される温度感受性プラスミドを用いた相同組換え法により取得した。具体的には、 $\alpha$ -KGDH遺伝子内には配列表配列番号1の1340番目と3266番目の2箇所にKpnIで消化される部位が存在する。そこで、実施例1で得られたpHSGS-XをKpnIで部分消化したのち自己結合させ、KpnI断片の1926塩基対を欠失したプラスミドpHSGS-X $\Delta$ Kを作成した。pHSGS-X $\Delta$ K上の $\alpha$ -KGDH遺伝子は

中央部分を欠失した構造になっている。次にpHSGS-X $\Delta$ KのBamHI認識部位に、コリネ型細菌で自己複製可能なプラスミドから取得した自己複製能が温度感受性になった変異型の複製起点を導入し、プラスミドpBTS-X $\Delta$ Kを作成した。具体的には、コリネ型細菌で自己複製可能なプラスミドから取得した自己複製能が温度感受性になった変異型の複製起点を持つプラスミドpHSC4（特開平5-7491号）を制限酵素KpnIで消化し、DNA平滑末端化キット（宝酒造社製、Blunting kit）を用い平滑末端化した後、BamHIリンカー（宝酒造社製）を結合させた後自己結合させて得たプラスミドを制限酵素BamHIで消化し、自己複製能が温度感受性になった変異型の複製起点を含む遺伝子断片を取得し、これをpHSGS-X $\Delta$ KのBamHI部位に挿入しプラスミドpBTS-X $\Delta$ Kを取得した。

このプラスミドをコリネ型L-グルタミン酸生産菌の野生株であるブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869に電気パルス法（特開平2-207791号）を用いて導入し、特開平5-7491号の方法で染色体上の $\alpha$ -KGDH遺伝子を欠失型に置換した。具体的には、プラスミドが導入されたATCC13869/pBTS-X $\Delta$ KをCM2G（ポリペプトン1%、酵母エキス1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.5%、pH7.2）液体培地で25℃にて6時間振とう培養した後、5 $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むCM2G寒天培地上に撒き、34℃で培養して形成したコロニーをプラスミド組み込み株として取得した。次に、この株から34℃でクロラムフェニコールに対して感受性になった株をレプリカ法により取得した。この感受性株から染色体上の $\alpha$ -KGDH遺伝子の塩基配列を調べ、 $\alpha$ -KGDH遺伝子が欠失型に置換されていることを確認し、これを $\Delta$ S株と命名した。 $\Delta$ S株の $\alpha$ -KGDH活性を実施例2に記した方法により測定したところ、活性は全く検出されなかった。

#### 実施例4 gdh、gltA及びicd遺伝子増幅用プラスミドの作製

##### (1) gdh、gltA及びicd遺伝子のクローニング

ブレバクテリウム・ラクトファーマンタムのgdh、gltA及びicd遺

伝子をPCR法でクローニングした。PCR法に用いるプライマーは、既に報告されているコリネバクテリウム・グルタミカムのg d h遺伝子(Molecular Microbiology, 6(3), 317-326 (1992))、g l t A遺伝子(Microbiology, 140, 1817-1828 (1994))及びi c d遺伝子(J. Bacteriol. (1995), 177, 774-782)の配列をもとに合成した。g d h遺伝子の増幅用のプライマーとしては、配列表配列番号5(5'側)と配列番号6(3'側)に示すオリゴヌクレオチド、g l t A遺伝子増幅用プライマーとしては、配列番号7(5'側)と配列番号8(3'側)に示すオリゴヌクレオチド、i c d遺伝子増幅用プライマーとしては、配列番号9(5'側)と配列番号10(3'側)に示すオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成し使用した。

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869から実施例1の方法により染色体DNAを調製し、これを鋳型とし上記オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いPCR法を行った。得られた増幅産物の両末端を市販のDNA末端平滑化キット(宝酒造社製、Blunting kit)を用い平滑末端化した後、ベクタープラスミドpHSG399(宝酒造社製)のSmaI部位にそれぞれクローニングし、プラスミドpHSG-g d h、pHSG-g l t A及びpHSG-i c dを得た。

## (2) p p c 遺伝子のクローニングと発現

実施例1の方法によりブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC 13869の染色体DNAを調製し、これを鋳型としてPEPCをコードするp p c遺伝子を含む約3.4KbpのDNA断片をPCR法を用いて取得した。PCR法に用いるプライマーは、既に報告されているコリネバクテリウム・グルタミカムのp p c遺伝子の配列(Gene, 77, 237-251 (1989))をもとに合成し、PCR反応は上記と同様にして行った。プライマーの配列を配列番号11(5'側)と配列番号12(3'側)に示す。

PCR反応の増幅産物を制限酵素Sal I(宝酒造社製)を用いて消化し、プラスミドpHSG399のSal I部位に挿入したプラスミドpHSG-p p c'を取得した。pHSG-p p c'のPEPC遺伝子はpHSG399のl a c

プロモーターと逆向きに挿入されている。

次に、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタムで機能するプロモーターとして知られているトリプトファンオペロンのプロモーター (Gene, 53, 191-200 (1987)) を p H S G - p p c' 上の p p c 遺伝子上流に挿入した。このプロモーターは配列表配列番号 1 3 に示す 51 塩基からなる配列で活性を示すことが知られている。このプロモーター活性を持つ 51 塩基対を含み、かつ両端が制限酵素 K p n I 及び X b a I による切断断片と一致するような 2 本鎖 DNA が得られる様に、配列番号 1 3 に示す配列を持つヌクレオチド鎖及びこれの相補鎖となる配列番号 1 4 の配列を持つヌクレオチド鎖を合成した。

合成した両 DNA を約 10 pmol/ $\mu$ l ずつの濃度になるように混合し、100℃、10 分加熱した後、室温で放冷しアニーリングさせた。p H S G - p p c' を制限酵素 K p n I 及び X b a I (宝酒造社製) により消化し、上記のプロモーターと結合させた。結合反応は宝酒造社製ライゲーションキットを用いて行った。これにより、p p c 遺伝子上流にトリプトファンオペロンのプロモーターが 1 コピー挿入されたプラスミド p H S G - p p c を得た。

(3) g d h、g l t A 及び i c d の 3 種類の遺伝子を連結したプラスミドの作製

g d h、g l t A 及び i c d の 3 種類の遺伝子を連結したプラスミドを作製した。具体的には、プラスミド p H S G - g d h を制限酵素 E c o R I で消化し、市販の DNA 末端平滑化キット (宝酒造社製、Blunting kit) を用い平滑末端化したものに上記の両末端を平滑末端化した g l t A 遺伝子の PCR 増幅産物を連結し、プラスミド p H S G - g d h + g l t A を取得した。更に、プラスミド p H S G - g d h + g l t A を制限酵素 K p n I で消化し、同様にして平滑末端化したものに上記の両末端を平滑末端化した i c d 遺伝子の PCR 増幅産物を連結し、プラスミド p H S G - g d h + g l t A + i c d を取得した。

(4) g d h、g l t A 及び p p c の 3 種類の遺伝子を連結したプラスミドの作製

g d h、g l t A 及び p p c の 3 種類の遺伝子を連結したプラスミドを作製し

- 27 -

た。具体的にはプラスミドpHSG-gdh+gl t Aを制限酵素Kpn Iで消化し、プラスミドpHSG-ppcを制限酵素Kpn I及びSal Iで消化し、上流にトリプトファンオペロンのプロモーターを持つppc遺伝子断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット（宝酒造社製、Blunting kit）を用い平滑末端化した後、Kpn Iリンカー（宝酒造社製）を用いてプラスミドpHSG-gdh+gl t AのKpn I部位に挿入し、プラスミドpHSG-gdh+gl t A+ppcを取得した。

（５）上記プラスミドへのコリネバクテリウムでの複製起点の導入

pHSG-gdh、pHSG-gl t A、pHSG-ppc、pHSG-icd、pHSG-gdh+gl t A+icd及びpHSG-gdh+gl t A+ppcをコリネ型細菌細胞内で自律複製可能にするために、既に取得されているコリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519（Agric. Biol. Chem., 48 2901-2903（1984））由来の複製起点（特開平5-7491号）をpHSG-gdh、pHSG-gl t A、pHSG-ppc、pHSG-icd、pHSG-gdh+gl t A+icd及びpHSG-gdh+gl t A+ppcに導入した。具体的には、pHM1519由来の複製起点を持つプラスミドpHK4（特開平5-7491号）を制限酵素BamH I及びKpn Iで消化し、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット（宝酒造社製、Blunting kit）を用い平滑末端化した後、Kpn Iリンカー（宝酒造社製）を用いてpHSG-gdh、pHSG-gl t A、pHSG-ppc及びpHSG-icdのKpn I部位にそれぞれ挿入し、pGDH、pGLTA、pPPC及びpICDを取得した。また、pHSG-gdh+gl t A+icd及びpHSG-gdh+gl t A+ppcには、そのSal I部位に同様にSal Iリンカー（宝酒造社製）を用い、pHM1519由来の複製起点をそれぞれ挿入し、pGDH+GLTA+ICD及びpGDH+GLTA+PPCを取得した。更に、対照として、これらの遺伝子を持たないプラスミドpHSG399を用い、そのSal I部位に同様にSal Iリンカー（宝酒造社製）を用い、pHM1519由来の複製起点を挿入したpSAC4も作成した。

実施例7 pGDH、pGLTA、pPPC、pICD、pGDH+GLTA+ICD及びpGDH+GLTA+PPC上の各遺伝子の発現の確認

pGDH、pGLTA、pPPC、pICD、pGDH+GLTA+ICD及びpGDH+GLTA+PPC上の各遺伝子がブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムの細胞内で発現し、これらのプラスミドが遺伝子増幅の機能を果たしていることの確認を行った。具体的には、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869に、電気パルス法（特開平2-207791号）によりそれぞれのプラスミドを導入した。得られた形質転換体は4 µg/mlのクロラムフェニコールを含むCM2Gプレート培地（ポリペプトン10g、酵母エキス10g、グルコース5g、NaCl5g及び寒天15gを純水1lに含む。pH7.2）にて選択した。得られた形質転換体をCM2G寒天培地上にて培養し、グルコース80g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1g、MgSO<sub>4</sub>0.4g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>30g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、大豆加水分解液15ml、サイアミン塩酸塩200 µg、ビオチン300 µg及びCaCO<sub>3</sub>50gを純水1l中に含む培地（KOHを用いてpHは8.0に調整されている）に接種し、31.5℃にて16時間培養した。該培養液を常法に従って遠心分離し、菌体を集めた。

菌体を破碎して得た粗抽出液を用いて、ATCC13869/pGDH、ATCC13869/GDH+GLTA+ICD及びATCC13869/pGDH+GLTA+PPCのGDH活性をMolecular Microbiology, 6(3), 317-326 (1992) 記載の方法に従い測定したところ、これらの形質転換体では、各々、対照のATCC13869/pSAC4に比べて約13倍のGDH活性を有することが分かった（表4）。また、ATCC13869/pGLTA及びATCC13869/GDH+GLTA+ICD及びATCC13869/pGDH+GLTA+PPCのCS活性は、Microbiology, 140, 1817-1828 (1994)に、ATCC13869/pICD及びATCC13869/GDH+GLTA+ICDのICDH活性は、J. Bacteriol., 177, 774-782 (1995)に、ATCC13869/pPPC及びATCC13869/pGDH+GLTA+PPCのPEPC活性はGene,

77, 237-251 (1989)に記載された方法に従って測定した。測定結果を表5～7に示す。いずれの形質転換体も目的の酵素について、対照のATCC13869/pSAC4に比べて約2～20倍の活性を有することが分かった。このことから、pGDH、pGLTA、pPPC、pICD、pGDH+GLTA+ICD及びpGDH+GLTA+PPC上の各遺伝子はブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム細胞内で発現しその機能を果たしていることが確認された。

表4

菌株	GDH活性 ( $\Delta$ Abs/min/mg protein)
ATCC13869/pGDH	1.36
ATCC13869/pGDH+GLTA+ICD	1.28
ATCC13869/pGDH+GLTA+PPC	1.33
ATCC13869/pSAC4	0.11

表5

菌株	CS活性 ( $\mu$ mol/min/mg protein)
ATCC13869/pGLTA	5.5
ATCC13869/pGDH+GLTA+ICD	4.8
ATCC13869/pGDH+GLTA+PPC	4.8
ATCC13869/pSAC4	0.7

- 30 -

表6

菌株	PEPC活性 (units/min/mg protein)
ATCC13869/pPPC	1.12
ATCC13869/pGDH+GLTA+PPC	1.04
ATCC13869/pSAC4	0.11

表7

菌株	ICDH活性 (units/min/mg protein)
ATCC13869/pICD	3.5
ATCC13869/pGDH+GLTA+ICD	2.8
ATCC13869/pSAC4	1.0

実施例8  $\Delta$ S株と、gdh、glta、ppc及びicd遺伝子を増幅した  
 $\Delta$ S株のL-グルタミン酸生産

(1)  $\Delta$ S株のジャーフェーマンターを用いたL-グルタミン酸生産評価

グルコース60g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4$  0.4g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g、大豆加水分解液15ml、サイアミン塩酸塩200 $\mu\text{g}$ 及びビオチン450 $\mu\text{g}$ を純水1l中に含む培地300mlを1l容ジャーフェーマンターに入れ加熱殺菌した。これにCM2G寒天培地上にて培養して得た $\Delta$ S株の菌体を接種し、31.5℃にて、pHをアンモニアガスで7.0、7.2又は7.5に制御しながら30時間培養した。

培養終了後、菌体濃度及び培地中に蓄積されたL-グルタミン酸の量を測定し



た。L-グルタミン酸の定量には、旭化成（株）製バイオテックアナライザー A S-210 を使用し、菌体濃度は、純水で 51 倍に希釈した培養液の 660 nm における吸光度（OD<sub>660</sub>）により測定した。結果を表 8 に示す。

表 8

pH	菌体濃度 (OD)	L-グルタミン酸 (g/l)
7.0	0.84	35
7.2	0.85	34
7.5	1.07	32

過剰量のビオチンを含有する培地で培養したにもかかわらず、 $\Delta$ S 株は高い収率で L-グルタミン酸を生成蓄積することが確認された。

(2)  $\Delta$ S 株と、gdh、glutA、ppc 及び icd 遺伝子を増幅した  $\Delta$ S 株の L-グルタミン酸生産のジャーフェメンターを用いた培養による評価

$\Delta$ S 株に上記の様に作製した pGDH、pGLTA、pPPC、pICD、pGDH+GLTA+ICD 又は pGDH+GLTA+PPC を導入し、それぞれのプラスミドが導入された形質転換体の L-グルタミン酸生産性を評価した。ブレヴィバクテリウム・ラクトフェメンタム細胞へのプラスミドの導入は電気パルス法（特開平 2-207791 号）により行った。得られた形質転換体は 4  $\mu$ g/ml のクロラムフェニコールを含む CM2G プレート培地（ポリペプトン 10 g、酵母エキス 10 g、グルコース 5 g、NaCl 5 g 及び寒天 15 g を純水 1 l に含む。pH 7.2）にて選択した。

$\Delta$ S 株と、得られた形質転換体の L-グルタミン酸の生産性の評価は、上記 (1) と同様にして行った。培養後の菌体濃度、及び培地中に蓄積された L-グルタミン酸の量を上記と同様に測定した。結果を表 9 に示す。

表 9

菌株	菌体濃度 (OD)	L-グルタミン酸 (g/l)
$\Delta S$	0.84	35
$\Delta S/pGDH$	1.01	35
$\Delta S/pGLTA$	0.83	37
$\Delta S/pICD$	0.83	37
$\Delta S/pPPC$	0.75	37
$\Delta S/pGDH+GLTA+ICD$	0.95	38
$\Delta S/pGDH+GLTA+PPC$	0.85	40
$\Delta S/pSAC4$	0.83	35

#### 実施例 9 $\alpha$ -KGDH遺伝子を増幅したL-リジン生産菌による

##### L-リジンの生産

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869から変異誘導されたS-(2-アミノエチル)-L-システインに耐性を示し、L-リジン生成能を有するブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12435 (FERM BP-2294) に上記の様に作成したpPKS-XとpPK4とをそれぞれ導入しそのL-リジン生産性を評価した。プラスミドの導入は電気パルス法(特開平2-207791号)を用いた。形質転換体は25mg/lのカナマイシンを含むCM2Gプレート培地(ポリペプトン10g、酵母エキス10g、グルコース5g、NaCl5g、寒天15gを純水1lに含む。pH7.2)にて選択した。

L-リジンの生産性の評価は以下の様にして行った。グルコース100g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1g、MgSO<sub>4</sub> 0.4g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、大豆加水分解液15ml、サイアミン塩酸塩200μg、ビオチン300μg、カナマイシン25mg及びC

aCO<sub>2</sub> 50 gを純水1 l中に含む培地（KOHを用いてpHは7.0に調整されている）を500 ml容フラスコに20 mlずつ分注し、加熱殺菌した。これに25 mg/lのカナマイシンを含むCM2Gプレート培地にて培養して得たAJ12435/pPK4及びAJ12435/pPKS-Xの菌体を接種し、37℃にて20時間培養した。培養終了後、培養液中に生成蓄積したL-リジンの量及び菌体濃度を測定した。その結果を表10に示す。

表10

菌 株	L-リジン (g/l)	菌体濃度 (OD)
AJ12435/pPK4	2.6	1.15
AJ12435/pPKS-X	3.1	0.92

#### 産業上の利用性

コリネ型L-グルタミン酸生産菌の $\alpha$ -KGDH活性のレベルがL-グルタミン酸の発酵生産に影響を及ぼすことが明らかとなった。従って、薬剤遺伝子の挿入等による $\alpha$ -KGDH遺伝子活性欠失株の取得、in vitro 変異による活性弱化株の取得、プロモーターの改変による発現低下株の取得等により、従来のコリネ型L-グルタミン酸生産菌と比較してさらにL-グルタミン酸生産能が向上した菌株を効率よく育種することが可能となる。

- 34 -

配列表

## (1) 一般情報

- (i) 出願人：味の素株式会社
- (ii) 発明の名称： $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子
- (iii) 配列数：14
- (iv) 連絡先：
  - (A) 宛名：
  - (B) 番地：
  - (C) 市：
  - (D) 州：
  - (E) 国：
  - (F) ZIP：
- (v) コンピュータ読取り可能形式
  - (A) 媒体：フロッピーディスク
  - (B) コンピュータ：IBM PC 互換
  - (C) 操作システム：PC-DOS/MS-DOS
  - (D) ソフトウェア：FastSEQ Version 1.5
- (vi) 現行出願データ
  - (A) 出願番号
  - (B) 出願日
  - (C) 分類
- (viii) 代理人／事務所情報
  - (A) 名前：
  - (B) 登録番号：
  - (C) 整理番号：
- (ix) 通信情報
  - (A) 電話番号：
  - (B) ファクシミリ番号：

## (2) 配列番号 1 の配列の情報：

- (i) 配列の性質：
  - (A) 配列の長さ：4394 base pairs
  - (B) 配列の型：核酸
  - (C) 鎖の数：2 本鎖

- 35 -

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: Genomic DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vi) 起源:

(A) 生物名: プレビバクテリウム・ラクトファーメントム

(B) 株名: ATCC13869

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 443..4213

(C) 特徴を決定した方法: E

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: -35 signal

(B) 存在位置: 281..287

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: -10 signal

(B) 存在位置: 307..312

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: RBS

(B) 存在位置: 421..428

(C) 特徴を決定した方法: S

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: terminator

(B) 存在位置: 4243..4281

(C) 特徴を決定した方法: S

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

GTCGACAAGC AAAATCGAAG CGGCAGCACG CCGCGTCGGA GCCTTAAACG CCATCGCCGC

- 36 -

CATCCCTGAT GGTTC AATC ATCAAGTCGG TGAACGCGGG CGCAACCTGT CATCCGGACA	120
GCGCCAACTG ATCGCGCTGG CGCGCGCCGA ACTCATCGAG CCTTCCATCA TGCTTCTCGA	180
CGAAGCCACC TCCACCCTCG ACCCCGCCAC CGAAGCCGTT ATCCTCAACG CCTCCGATCG	240
AGTCACTAAG GGACGCACCA GCATCATCGT CGCGCACCGC TTGGCAACCG CTAAGAGGGC	300
CGACCGTATT CTTGTTGTTG AACAAGGACG TATCATTGAG GACGGATCTC ACGACGCGTT	360
GTTGTCTGCT AACGGCACCT ACGCCCGCAT GTGGCATTTA ATGGCCTGAC ACGTTATTTT	420
TAGGAGAACT GTCAACAAAT TA ATG CTA CAA CTG GGG CTT AGG CAT AAT CAG	472
Met Leu Gln Leu Gly Leu Arg His Asn Gln	
1 5 10	
CCA ACG ACC AAC GTT ACA GTG GAT AAA ATA AAG CTC AAT AAA CCC TCA	520
Pro Thr Thr Asn Val Thr Val Asp Lys Ile Lys Leu Asn Lys Pro Ser	
15 20 25	
AGA AGC AAG GAA AAG AGG CGA GTA CCT GCC GTG AGC AGC GCT AGT ACT	568
Arg Ser Lys Glu Lys Arg Arg Val Pro Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr	
30 35 40	
TTC GGC CAG AAT GCG TGG CTG GTA GAC GAG ATG TTC CAG CAG TTC CAG	616
Phe Gly Gln Asn Ala Trp Leu Val Asp Glu Met Phe Gln Gln Phe Gln	
45 50 55	
AAG GAC CCC AAG TCC GTG GAC AAG GAA TGG AGA GAA CTC TTT GAG GCG	664
Lys Asp Pro Lys Ser Val Asp Lys Glu Trp Arg Glu Leu Phe Glu Ala	
60 65 70	
CAG GGG GGA CCA AAT GCT ACC CCC GCT ACA ACA GAA GCA CAG CCT TCA	712
Gln Gly Gly Pro Asn Ala Thr Pro Ala Thr Thr Glu Ala Gln Pro Ser	
75 80 85 90	
GCG CCC AAG GAG TCT GCG AAA CCA GCA CCA AAG GCT GCC CCT GCA GCC	760
Ala Pro Lys Glu Ser Ala Lys Pro Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Ala	
95 100 105	
AAG GCA GCA CCG CGC GTA GAA ACC AAG CCG GCC GCC AAG ACC GCC CCT	808
Lys Ala Ala Pro Arg Val Glu Thr Lys Pro Ala Ala Lys Thr Ala Pro	
110 115 120	

- 37 -

AAG GCC AAG GAG TCC TCA GTG CCA CAG CAA CCT AAG CTT CCG GAG CCA	856
Lys Ala Lys Glu Ser Ser Val Pro Gln Gln Pro Lys Leu Pro Glu Pro	
125 130 135	
GGA CAA ACC CCA ATC AGG GGT ATT TTC AAG TCC ATC GCG AAG AAC ATG	904
Gly Gln Thr Pro Ile Arg Gly Ile Phe Lys Ser Ile Ala Lys Asn Met	
140 145 150	
GAT ATC TCC CTG GAA ATC CCA ACC GCA ACC TCG GTT CGC GAT ATG CCA	952
Asp Ile Ser Leu Glu Ile Pro Thr Ala Thr Ser Val Arg Asp Met Pro	
155 160 165 170	
GCT CGC CTC ATG TTC GAA AAC CGC GCG ATG GTC AAC GAT CAG CTC AAG	1000
Ala Arg Leu Met Phe Glu Asn Arg Ala Met Val Asn Asp Gln Leu Lys	
175 180 185	
CGC ACC CGC GGT GGC AAG ATC TCC TTC ACC CAC ATC ATT GGC TAC GCC	1048
Arg Thr Arg Gly Gly Lys Ile Ser Phe Thr His Ile Ile Gly Tyr Ala	
190 195 200	
ATG GTG AAG GCA GTC ATG GCT CAC CCG GAC ATG AAC AAC TCC TAC GAC	1096
Met Val Lys Ala Val Met Ala His Pro Asp Met Asn Asn Ser Tyr Asp	
205 210 215	
GTC ATC GAC GGC AAG CCA ACC CTG ATC GTG CCT GAG CAC ATC AAC CTG	1144
Val Ile Asp Gly Lys Pro Thr Leu Ile Val Pro Glu His Ile Asn Leu	
220 225 230	
GGC CTT GCC ATC GAC CTT CCT CAG AAG GAC GGC TCC CGC GCA CTT GTC	1192
Gly Leu Ala Ile Asp Leu Pro Gln Lys Asp Gly Ser Arg Ala Leu Val	
235 240 245 250	
GTA GCA GCC ATC AAG GAA ACC GAG AAG ATG AAC TTC TCC GAG TTC CTC	1240
Val Ala Ala Ile Lys Glu Thr Glu Lys Met Asn Phe Ser Glu Phe Leu	
255 260 265	
GCA GCA TAC GAA GAC ATC GTG ACA CGC TCC CGC AAG GGC AAG CTC ACC	1288
Ala Ala Tyr Glu Asp Ile Val Thr Arg Ser Arg Lys Gly Lys Leu Thr	
270 275 280	

- 38 -

ATG GAT GAC TAC CAG GGC GTT ACC GTT TCC TTG ACC AAC CCA GGT GGC	1336
Met Asp Asp Tyr Gln Gly Val Thr Val Ser Leu Thr Asn Pro Gly Gly	
285 290 295	
ATC GGT ACC CGC CAC TCT GTC CCA CGT CTG ACC AAG GGC CAG GGC ACC	1384
Ile Gly Thr Arg His Ser Val Pro Arg Leu Thr Lys Gly Gln Gly Thr	
300 305 310	
ATC ATC GGT GTC GGT TCC ATG GAT TAC CCA GCA GAG TTC CAG GGC GCT	1432
Ile Ile Gly Val Gly Ser Met Asp Tyr Pro Ala Glu Phe Gln Gly Ala	
315 320 325 330	
TCC GAA GAC CGC CTT GCA GAG CTC GGC GTT GGA AAG CTT GTC ACC ATC	1480
Ser Glu Asp Arg Leu Ala Glu Leu Gly Val Gly Lys Leu Val Thr Ile	
335 340 345	
ACC TCC ACC TAC GAT CAC CGC GTG ATC CAG GGT GCT GTG TCC GGT GAA	1528
Thr Ser Thr Tyr Asp His Arg Val Ile Gln Gly Ala Val Ser Gly Glu	
350 355 360	
TTC CTG CGT ACC ATG TCT CGC CTG CTC ACC GAT GAT TCC TTC TGG GAT	1576
Phe Leu Arg Thr Met Ser Arg Leu Leu Thr Asp Asp Ser Phe Trp Asp	
365 370 375	
GAG ATC TTC GAC GCA ATG AAC GTT CCT TAC ACC CCA ATG CGT TGG GCA	1624
Glu Ile Phe Asp Ala Met Asn Val Pro Tyr Thr Pro Met Arg Trp Ala	
380 385 390	
CAG GAC GTT CCA AAC ACC GGT GTT GAT AAG AAC ACC CGC GTC ATG CAG	1672
Gln Asp Val Pro Asn Thr Gly Val Asp Lys Asn Thr Arg Val Met Gln	
395 400 405 410	
CTC ATT GAG GCA TAC CGC TCC CGT GGA CAC CTC ATC GCT GAC ACC AAC	1720
Leu Ile Glu Ala Tyr Arg Ser Arg Gly His Leu Ile Ala Asp Thr Asn	
415 420 425	
CCA CTT TCA TGG GTT CAG CCT GGC ATG CCA GTT CCA GAC CAC CGC GAC	1768
Pro Leu Ser Trp Val Gln Pro Gly Met Pro Val Pro Asp His Arg Asp	
430 435 440	



- 39 -

CTC GAC ATC GAG ACC CAC AGC CTG ACC ATC TGG GAT CTG GAC CGT ACC	1816
Leu Asp Ile Glu Thr His Ser Leu Thr Ile Trp Asp Leu Asp Arg Thr	
445 450 455	
TTC AGC GTC GGT GGC TTC GGC GGC AAG GAG ACC ATG ACC CTG CGC GAG	1864
Phe Ser Val Gly Gly Phe Gly Gly Lys Glu Thr Met Thr Leu Arg Glu	
460 465 470	
GTA CTG TCC CGC CTG CGC GCT GCC TAC ACC TTG AAG GTC GGC TCC GAA	1912
Val Leu Ser Arg Leu Arg Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Val Gly Ser Glu	
475 480 485 490	
TAC ACC CAC ATC CTG GAC CGC GAC GAG CGC ACC TGG CTG CAG GAC CGC	1960
Tyr Thr His Ile Leu Asp Arg Asp Glu Arg Thr Trp Leu Gln Asp Arg	
495 500 505	
CTC GAA GCC GGA ATG CCA AAG CCA ACC CAG GCA GAG CAG AAG TAC ATC	2008
Leu Glu Ala Gly Met Pro Lys Pro Thr Gln Ala Glu Gln Lys Tyr Ile	
510 515 520	
CTG CAG AAG CTG AAC GCC GCA GAG GCT TTC GAG AAC TTC CTG CAG ACC	2056
Leu Gln Lys Leu Asn Ala Ala Glu Ala Phe Glu Asn Phe Leu Gln Thr	
525 530 535	
AAG TAC GTC GGC CAG AAG CGC TTC TCC CTC GAA GGT GCA GAA GCT CTC	2104
Lys Tyr Val Gly Gln Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly Ala Glu Ala Leu	
540 545 550	
ATC CCA CTG ATG GAC TCC GCC ATC GAC ACC GCC GCA GGC CAG GGC CTC	2152
Ile Pro Leu Met Asp Ser Ala Ile Asp Thr Ala Ala Gly Gln Gly Leu	
555 560 565 570	
GAC GAA GTT GTC ATC GGT ATG CCA CAC CGT GGT CGC CTC AAC GTG CTG	2200
Asp Glu Val Val Ile Gly Met Pro His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu	
575 580 585	
TTC AAC ATC GTG GGC AAG CCA CTG GCA TCC ATC TTC AAC GAG TTT GAA	2248
Phe Asn Ile Val Gly Lys Pro Leu Ala Ser Ile Phe Asn Glu Phe Glu	
590 595 600	

- 40 -

GGC CAA ATG GAG CAG GGC CAG ATC GGT GGC TCC GGT GAC GTG AAG TAC	2296
Gly Gln Met Glu Gln Gly Gln Ile Gly Gly Ser Gly Asp Val Lys Tyr	
605 610 615	
CAC CTC GGT TCC GAA GGC CAG CAC CTG CAG ATG TTC GGC GAC GGC GAG	2344
His Leu Gly Ser Glu Gly Gln His Leu Gln Met Phe Gly Asp Gly Glu	
620 625 630	
ATC AAG GTC TCC CTG ACT GCT AAC CCG TCC CAC CTG GAA GCT GTT AAC	2392
Ile Lys Val Ser Leu Thr Ala Asn Pro Ser His Leu Glu Ala Val Asn	
635 640 645 650	
CCA GTG ATG GAA GGT ATC GTC CGC GCA AAG CAG GAC TAC CTG GAC AAG	2440
Pro Val Met Glu Gly Ile Val Arg Ala Lys Gln Asp Tyr Leu Asp Lys	
655 660 665	
GGC GTA GAC GGC AAG ACT GTT GTG CCA CTG CTG CTC CAC GGT GAC GCT	2488
Gly Val Asp Gly Lys Thr Val Val Pro Leu Leu Leu His Gly Asp Ala	
670 675 680	
GCA TTC GCA GGC CTG GGC ATC GTG CCA GAA ACC ATC AAC CTG GCT AAG	2536
Ala Phe Ala Gly Leu Gly Ile Val Pro Glu Thr Ile Asn Leu Ala Lys	
685 690 695	
CTG CGT GGC TAC GAC GTC GGA GGC ACC ATC CAC ATC GTG GTG AAC AAC	2584
Leu Arg Gly Tyr Asp Val Gly Gly Thr Ile His Ile Val Val Asn Asn	
700 705 710	
CAG ATC GGC TTC ACC ACC ACC CCA GAC TCC AGC CGC TCC ATG CAC TAC	2632
Gln Ile Gly Phe Thr Thr Thr Pro Asp Ser Ser Arg Ser Met His Tyr	
715 720 725 730	
GCA ACC GAC TAC GCC AAG GCA TTC GGC TGC CCA GTC TTC CAC GTC AAT	2680
Ala Thr Asp Tyr Ala Lys Ala Phe Gly Cys Pro Val Phe His Val Asn	
735 740 745	
GGT GAT GAC CCA GAG GCA GTT GTC TGG GTT GGC CAG CTG GCA ACC GAG	2728
Gly Asp Asp Pro Glu Ala Val Val Trp Val Gly Gln Leu Ala Thr Glu	
750 755 760	

- 41 -

TAC CGT CGT CGC TTC GGC AAG GAC GTC TTC ATC GAC CTC GTT TGC TAC	2776
Tyr Arg Arg Arg Phe Gly Lys Asp Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr	
765 770 775	
CGC CTC CGC GGC CAC AAC GAA GCT GAT GAT CCT TCC ATG ACC CAG CCA	2824
Arg Leu Arg Gly His Asn Glu Ala Asp Asp Pro Ser Met Thr Gln Pro	
780 785 790	
AAG ATG TAT GAG CTC ATC ACC GGC CGC GAG ACC GTT CGT GCT CAG TAC	2872
Lys Met Tyr Glu Leu Ile Thr Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Gln Tyr	
795 800 805 810	
ACC GAA GAC CTG CTC GGA CGT GGA GAC CTC TCC AAC GAA GAT GCA GAA	2920
Thr Glu Asp Leu Leu Gly Arg Gly Asp Leu Ser Asn Glu Asp Ala Glu	
815 820 825	
GCA GTC GTC CGC GAC TTC CAC GAC CAG ATG GAA TCT GTG TTC AAC GAA	2968
Ala Val Val Arg Asp Phe His Asp Gln Met Glu Ser Val Phe Asn Glu	
830 835 840	
GTC AAG GAA GGC GGC AAG AAG CAG GCT GAG GCA CAG ACC GGC ATC ACC	3016
Val Lys Glu Gly Gly Lys Lys Gln Ala Glu Ala Gln Thr Gly Ile Thr	
845 850 855	
GGC TCC CAG AAG CTT CCA CAC GGC CTT GAG ACC AAC ATC TCC CGT GAA	3064
Gly Ser Gln Lys Leu Pro His Gly Leu Glu Thr Asn Ile Ser Arg Glu	
860 865 870	
GAG CTC CTG GAA CTG GGA CAG GCT TTC GCC AAC ACC CCA GAA GGC TTC	3112
Glu Leu Leu Glu Leu Gly Gln Ala Phe Ala Asn Thr Pro Glu Gly Phe	
875 880 885 890	
AAC TAC CAC CCA CGT GTG GCT CCA GTT GCT AAG AAG CGC GTC TCC TCT	3160
Asn Tyr His Pro Arg Val Ala Pro Val Ala Lys Lys Arg Val Ser Ser	
895 900 905	
GTC ACC GAA GGT GGC ATC GAC TGG GCA TGG GGC GAG CTC CTC GCC TTC	3208
Val Thr Glu Gly Gly Ile Asp Trp Ala Trp Gly Glu Leu Leu Ala Phe	
910 915 920	

- 42 -

GGT TCC CTG GCT AAC TCC GGC CGC TTG GTT CGC CTT GCA GGT GAA GAT	3256
Gly Ser Leu Ala Asn Ser Gly Arg Leu Val Arg Leu Ala Gly Glu Asp	
925 930 935	
TCC CGC CGC GGT ACC TTC ACC CAG CGC CAC GCA GTT GCC ATC GAC CCA	3304
Ser Arg Arg Gly Thr Phe Thr Gln Arg His Ala Val Ala Ile Asp Pro	
940 945 950	
GCG ACC GCT GAA GAG TTC AAC CCA CTC CAC GAG CTT GCA CAG TCC AAG	3352
Ala Thr Ala Glu Glu Phe Asn Pro Leu His Glu Leu Ala Gln Ser Lys	
955 960 965 970	
GGC AAC AAC GGT AAG TTC CTG GTC TAC AAC TCC GCA CTG ACC GAG TAC	3400
Gly Asn Asn Gly Lys Phe Leu Val Tyr Asn Ser Ala Leu Thr Glu Tyr	
975 980 985	
GCA GGC ATG GGC TTC GAG TAC GGC TAC TCC GTA GGA AAC GAA GAC TCC	3448
Ala Gly Met Gly Phe Glu Tyr Gly Tyr Ser Val Gly Asn Glu Asp Ser	
990 995 1000	
GTC GTT GCA TGG GAA GCA CAG TTC GGC GAC TTC GCC AAC GGC GCT CAG	3496
Val Val Ala Trp Glu Ala Gln Phe Gly Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln	
1005 1010 1015	
ACC ATC ATC GAT GAG TAC GTC TCC TCA GGC GAA GCT AAG TGG GGC CAG	3544
Thr Ile Ile Asp Glu Tyr Val Ser Ser Gly Glu Ala Lys Trp Gly Gln	
1020 1025 1030	
ACC TCC AAG CTG ATC CTT CTG CTG CCT CAC GGC TAC GAA GGC CAG GGC	3592
Thr Ser Lys Leu Ile Leu Leu Leu Pro His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly	
1035 1040 1045 1050	
CCA GAC CAC TCT TCC GCA CGT ATC GAG CGC TTC CTG CAG CTG TGC GCT	3640
Pro Asp His Ser Ser Ala Arg Ile Glu Arg Phe Leu Gln Leu Cys Ala	
1055 1060 1065	
GAG GGT TCC ATG ACT GTT GCT CAG CCA TCC ACC CCA GCA AAC CAC TTC	3688
Glu Gly Ser Met Thr Val Ala Gln Pro Ser Thr Pro Ala Asn His Phe	
1070 1075 1080	

- 43 -

CAC CTG CTG CGT CGT CAC GCT CTG TCC GAC CTG AAG CGT CCA CTG GTT	3736
His Leu Leu Arg Arg His Ala Leu Ser Asp Leu Lys Arg Pro Leu Val	
1085 1090 1095	
ATC TTC ACC CCG AAG TCC ATG CTG CGT AAC AAG GCT GCT GCC TCC GCA	3784
Ile Phe Thr Pro Lys Ser Met Leu Arg Asn Lys Ala Ala Ala Ser Ala	
1100 1105 1110	
CCA GAA GAC TTC ACT GAG GTC ACC AAG TTC CAA TCC GTG ATC GAC GAT	3832
Pro Glu Asp Phe Thr Glu Val Thr Lys Phe Gln Ser Val Ile Asp Asp	
1115 1120 1125 1130	
CCA AAC GTT GCA GAT GCA GCC AAG GTG AAG AAG GTC ATG CTG GTC TCC	3880
Pro Asn Val Ala Asp Ala Ala Lys Val Lys Lys Val Met Leu Val Ser	
1135 1140 1145	
GGC AAG CTG TAC TAC GAA TTG GCA AAG CGC AAG GAG AAG GAC GGA CGC	3928
Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Leu Ala Lys Arg Lys Glu Lys Asp Gly Arg	
1150 1155 1160	
GAC GAC ATC GCG ATC GTT CGT ATC GAA ATG CTC CAC CCA ATT CCG TTC	3976
Asp Asp Ile Ala Ile Val Arg Ile Glu Met Leu His Pro Ile Pro Phe	
1165 1170 1175	
AAC CGC ATC TCC GAG GCT CTT GCC GGC TAC CCT AAC GCT GAG GAA GTC	4024
Asn Arg Ile Ser Glu Ala Leu Ala Gly Tyr Pro Asn Ala Glu Glu Val	
1180 1185 1190	
CTC TTC GTT CAG GAT GAG CCA GCA AAC CAG GGC CCA TGG CCG TTC TAC	4072
Leu Phe Val Gln Asp Glu Pro Ala Asn Gln Gly Pro Trp Pro Phe Tyr	
1195 1200 1205 1210	
CAG GAG CAC CTC CCA GAG CTG ATC CCG AAC ATG CCA AAG ATG CGC CGC	4120
Gln Glu His Leu Pro Glu Leu Ile Pro Asn Met Pro Lys Met Arg Arg	
1215 1220 1225	
GTT TCC CGC CGC GCT CAG TCC TCC ACC GCA ACT GGT GTT GCT AAG GTG	4168
Val Ser Arg Arg Ala Gln Ser Ser Thr Ala Thr Gly Val Ala Lys Val	
1230 1235 1240	

- 44 -

CAC CAG CTG GAG GAG AAG CAG CTT ATC GAC GAG GCT TTC GAG GCT	4213
His Gln Leu Glu Glu Lys Gln Leu Ile Asp Glu Ala Phe Glu Ala	
1245 1250 1255	
TAAGTCTTTA TAGTCCTGCA CTAGCCTAGA GGGCCTTATG CAGTGTGAAT CACACAGCAT	4273
AAGGCCCTTT TTGCTGCCGT GGTTCCTAA GGTGGAAGGC ATGAAACGAA TCTGTGCGGT	4333
CACGATCTCT TCAGTACTTT TGCTAAGTGG CTGCTCCTCC ACTTCCACCA CGCAGCTCGA	4393
G	4394

## (2) 配列番号 2 の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 1257アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: タンパク質

## (xi) 配列: SEQ ID NO:2:

Met Leu Gln Leu Gly Leu Arg His Asn Gln Pro Thr Thr Asn Val Thr	
1 5 10 15	
Val Asp Lys Ile Lys Leu Asn Lys Pro Ser Arg Ser Lys Glu Lys Arg	
20 25 30	
Arg Val Pro Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr Phe Gly Gln Asn Ala Trp	
35 40 45	
Leu Val Asp Glu Met Phe Gln Gln Phe Gln Lys Asp Pro Lys Ser Val	
50 55 60	
Asp Lys Glu Trp Arg Glu Leu Phe Glu Ala Gln Gly Gly Pro Asn Ala	
65 70 75 80	
Thr Pro Ala Thr Thr Glu Ala Gln Pro Ser Ala Pro Lys Glu Ser Ala	
85 90 95	
Lys Pro Ala Pro Lys Ala Ala Pro Ala Ala Lys Ala Ala Pro Arg Val	
100 105 110	
Glu Thr Lys Pro Ala Ala Lys Thr Ala Pro Lys Ala Lys Glu Ser Ser	

- 45 -

115	120	125	
Val Pro Gln Gln Pro Lys Leu Pro Glu Pro Gly Gln Thr Pro Ile Arg			
130	135	140	
Gly Ile Phe Lys Ser Ile Ala Lys Asn Met Asp Ile Ser Leu Glu Ile			
145	150	155	160
Pro Thr Ala Thr Ser Val Arg Asp Met Pro Ala Arg Leu Met Phe Glu			
	165	170	175
Asn Arg Ala Met Val Asn Asp Gln Leu Lys Arg Thr Arg Gly Gly Lys			
	180	185	190
Ile Ser Phe Thr His Ile Ile Gly Tyr Ala Met Val Lys Ala Val Met			
	195	200	205
Ala His Pro Asp Met Asn Asn Ser Tyr Asp Val Ile Asp Gly Lys Pro			
	210	215	220
Thr Leu Ile Val Pro Glu His Ile Asn Leu Gly Leu Ala Ile Asp Leu			
225	230	235	240
Pro Gln Lys Asp Gly Ser Arg Ala Leu Val Val Ala Ala Ile Lys Glu			
	245	250	255
Thr Glu Lys Met Asn Phe Ser Glu Phe Leu Ala Ala Tyr Glu Asp Ile			
	260	265	270
Val Thr Arg Ser Arg Lys Gly Lys Leu Thr Met Asp Asp Tyr Gln Gly			
	275	280	285
Val Thr Val Ser Leu Thr Asn Pro Gly Gly Ile Gly Thr Arg His Ser			
	290	295	300
Val Pro Arg Leu Thr Lys Gly Gln Gly Thr Ile Ile Gly Val Gly Ser			
305	310	315	320
Met Asp Tyr Pro Ala Glu Phe Gln Gly Ala Ser Glu Asp Arg Leu Ala			
	325	330	335
Glu Leu Gly Val Gly Lys Leu Val Thr Ile Thr Ser Thr Tyr Asp His			
	340	345	350
Arg Val Ile Gln Gly Ala Val Ser Gly Glu Phe Leu Arg Thr Met Ser			

- 46 -

355	360	365
Arg Leu Leu Thr Asp Asp Ser Phe Trp Asp Glu Ile Phe Asp Ala Met		
370	375	380
Asn Val Pro Tyr Thr Pro Met Arg Trp Ala Gln Asp Val Pro Asn Thr		
385	390	395
Gly Val Asp Lys Asn Thr Arg Val Met Gln Leu Ile Glu Ala Tyr Arg		
405	410	415
Ser Arg Gly His Leu Ile Ala Asp Thr Asn Pro Leu Ser Trp Val Gln		
420	425	430
Pro Gly Met Pro Val Pro Asp His Arg Asp Leu Asp Ile Glu Thr His		
435	440	445
Ser Leu Thr Ile Trp Asp Leu Asp Arg Thr Phe Ser Val Gly Gly Phe		
450	455	460
Gly Gly Lys Glu Thr Met Thr Leu Arg Glu Val Leu Ser Arg Leu Arg		
465	470	475
Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Val Gly Ser Glu Tyr Thr His Ile Leu Asp		
485	490	495
Arg Asp Glu Arg Thr Trp Leu Gln Asp Arg Leu Glu Ala Gly Met Pro		
500	505	510
Lys Pro Thr Gln Ala Glu Gln Lys Tyr Ile Leu Gln Lys Leu Asn Ala		
515	520	525
Ala Glu Ala Phe Glu Asn Phe Leu Gln Thr Lys Tyr Val Gly Gln Lys		
530	535	540
Arg Phe Ser Leu Glu Gly Ala Glu Ala Leu Ile Pro Leu Met Asp Ser		
545	550	555
Ala Ile Asp Thr Ala Ala Gly Gln Gly Leu Asp Glu Val Val Ile Gly		
565	570	575
Met Pro His Arg Gly Arg Leu Asn Val Leu Phe Asn Ile Val Gly Lys		
580	585	590
Pro Leu Ala Ser Ile Phe Asn Glu Phe Glu Gly Gln Met Glu Gln Gly		



- 47 -

595	600	605
Gln Ile Gly Gly Ser Gly Asp Val Lys Tyr His Leu Gly Ser Glu Gly		
610	615	620
Gln His Leu Gln Met Phe Gly Asp Gly Glu Ile Lys Val Ser Leu Thr		
625	630	635
Ala Asn Pro Ser His Leu Glu Ala Val Asn Pro Val Met Glu Gly Ile		
645	650	655
Val Arg Ala Lys Gln Asp Tyr Leu Asp Lys Gly Val Asp Gly Lys Thr		
660	665	670
Val Val Pro Leu Leu Leu His Gly Asp Ala Ala Phe Ala Gly Leu Gly		
675	680	685
Ile Val Pro Glu Thr Ile Asn Leu Ala Lys Leu Arg Gly Tyr Asp Val		
690	695	700
Gly Gly Thr Ile His Ile Val Val Asn Asn Gln Ile Gly Phe Thr Thr		
705	710	715
Thr Pro Asp Ser Ser Arg Ser Met His Tyr Ala Thr Asp Tyr Ala Lys		
725	730	735
Ala Phe Gly Cys Pro Val Phe His Val Asn Gly Asp Asp Pro Glu Ala		
740	745	750
Val Val Trp Val Gly Gln Leu Ala Thr Glu Tyr Arg Arg Arg Phe Gly		
755	760	765
Lys Asp Val Phe Ile Asp Leu Val Cys Tyr Arg Leu Arg Gly His Asn		
770	775	780
Glu Ala Asp Asp Pro Ser Met Thr Gln Pro Lys Met Tyr Glu Leu Ile		
785	790	795
Thr Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Gln Tyr Thr Glu Asp Leu Leu Gly		
805	810	815
Arg Gly Asp Leu Ser Asn Glu Asp Ala Glu Ala Val Val Arg Asp Phe		
820	825	830
His Asp Gln Met Glu Ser Val Phe Asn Glu Val Lys Glu Gly Gly Lys		

- 48 -

835	840	845
Lys Gln Ala Glu Ala Gln Thr Gly Ile Thr Gly Ser Gln Lys Leu Pro		
850	855	860
His Gly Leu Glu Thr Asn Ile Ser Arg Glu Glu Leu Leu Glu Leu Gly		
865	870	875
Gln Ala Phe Ala Asn Thr Pro Glu Gly Phe Asn Tyr His Pro Arg Val		
885	890	895
Ala Pro Val Ala Lys Lys Arg Val Ser Ser Val Thr Glu Gly Gly Ile		
900	905	910
Asp Trp Ala Trp Gly Glu Leu Leu Ala Phe Gly Ser Leu Ala Asn Ser		
915	920	925
Gly Arg Leu Val Arg Leu Ala Gly Glu Asp Ser Arg Arg Gly Thr Phe		
930	935	940
Thr Gln Arg His Ala Val Ala Ile Asp Pro Ala Thr Ala Glu Glu Phe		
945	950	955
Asn Pro Leu His Glu Leu Ala Gln Ser Lys Gly Asn Asn Gly Lys Phe		
965	970	975
Leu Val Tyr Asn Ser Ala Leu Thr Glu Tyr Ala Gly Met Gly Phe Glu		
980	985	990
Tyr Gly Tyr Ser Val Gly Asn Glu Asp Ser Val Val Ala Trp Glu Ala		
995	1000	1005
Gln Phe Gly Asp Phe Ala Asn Gly Ala Gln Thr Ile Ile Asp Glu Tyr		
1010	1015	1020
Val Ser Ser Gly Glu Ala Lys Trp Gly Gln Thr Ser Lys Leu Ile Leu		
1025	1030	1035
Leu Leu Pro His Gly Tyr Glu Gly Gln Gly Pro Asp His Ser Ser Ala		
1045	1050	1055
Arg Ile Glu Arg Phe Leu Gln Leu Cys Ala Glu Gly Ser Met Thr Val		
1060	1065	1070
Ala Gln Pro Ser Thr Pro Ala Asn His Phe His Leu Leu Arg Arg His		

- 49 -

1075	1080	1085
Ala Leu Ser Asp Leu Lys Arg Pro Leu Val Ile Phe Thr Pro Lys Ser		
1090	1095	1100
Met Leu Arg Asn Lys Ala Ala Ala Ser Ala Pro Glu Asp Phe Thr Glu		
1105	1110	1115
Val Thr Lys Phe Gln Ser Val Ile Asp Asp Pro Asn Val Ala Asp Ala		
1125	1130	1135
Ala Lys Val Lys Lys Val Met Leu Val Ser Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu		
1140	1145	1150
Leu Ala Lys Arg Lys Glu Lys Asp Gly Arg Asp Asp Ile Ala Ile Val		
1155	1160	1165
Arg Ile Glu Met Leu His Pro Ile Pro Phe Asn Arg Ile Ser Glu Ala		
1170	1175	1180
Leu Ala Gly Tyr Pro Asn Ala Glu Glu Val Leu Phe Val Gln Asp Glu		
1185	1190	1195
Pro Ala Asn Gln Gly Pro Trp Pro Phe Tyr Gln Glu His Leu Pro Glu		
1205	1210	1215
Leu Ile Pro Asn Met Pro Lys Met Arg Arg Val Ser Arg Arg Ala Gln		
1220	1225	1230
Ser Ser Thr Ala Thr Gly Val Ala Lys Val His Gln Leu Glu Glu Lys		
1235	1240	1245
Gln Leu Ile Asp Glu Ala Phe Glu Ala		
1250	1255	

## (2) 配列番号3の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 20 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

- 50 -

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

CTGTCTGAAG GATCGGTTCT 20

(2) 配列番号4の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 29 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

GAGTGCTCAG GCCCCTGTCC CTCGTAACC 29

(2) 配列番号5の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

GCTAGCCTCG GGAGCTCTAG 20

- 51 -

## (2) 配列番号 6 の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

GATCTTTCCC AGACTCTGGC 20

## (2) 配列番号 7 の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

TAATGCCACC GACACCCACC 20

## (2) 配列番号 8 の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 20 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

- 52 -

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
(iii) ハイボセティカル: NO  
(iv) アンチセンス: YES  
(xi) 配列: SEQ ID NO:8:  
TCAACGCCCA CATAGTGGAC 20

(2) 配列番号9の配列の情報:

(i) 配列の性質:  
(A) 配列の長さ: 20 base pairs  
(B) 配列の型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖状  
(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
(iii) ハイボセティカル: NO  
(iv) アンチセンス: NO  
(xi) 配列: SEQ ID NO:9:  
GAATTCGCTC CCGGTGACGC 20

(2) 配列番号10の配列の情報:

(i) 配列の性質:  
(A) 配列の長さ: 20 base pairs  
(B) 配列の型: 核酸  
(C) 鎖の数: 一本鎖  
(D) トポロジー: 直鎖状  
(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA  
(iii) ハイボセティカル: NO  
(iv) アンチセンス: YES  
(xi) 配列: SEQ ID NO:10:  
GATGCAGAAT TCCTGTCCG 20

## (2) 配列番号11の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 20 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:11:

GTCGACGGCG GACTTGTCGG 20

## (2) 配列番号12の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 20 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:12:

GTCGACAAAA CCCAAAAAAA 20

## (2) 配列番号13の配列の情報:

## (i) 配列の性質:

- (A) 配列の長さ: 51 base pairs
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

- 54 -

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: SEQ ID NO:13:

CTGCGGAAAC TACACAAGAA CCCAAAAATG ATTAATAATT GAGACAAGCT T 51

(2) 配列番号14の配列の情報:

(i) 配列の性質:

(A) 配列の長さ: 59 base pairs

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(xi) 配列: SEQ ID NO:51:

CTAGAAGCTT GTCTCAATTA TTAATCATTT TTGGGTTC TTGTAGTTTC CGCAGGTAC 59

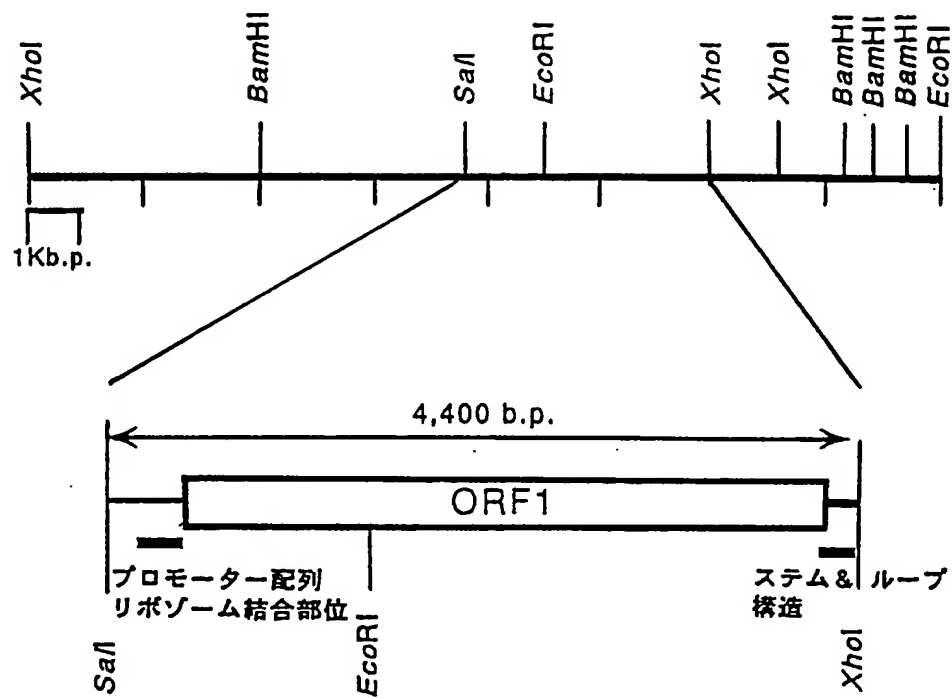


## 請求の範囲

1. 染色体上に存在する $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子又はそのプロモーターの塩基配列中に1又は2以上の塩基の置換、欠失、挿入、付加又は逆位が生じたことにより、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性が欠損したコリネ型L-グルタミン酸生産菌。
2. 請求項1記載のコリネ型L-グルタミン酸生産菌を液体培地中に培養し、培養液中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。
3. コリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子。
4.  $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列が配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列又はこのアミノ酸配列において $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性に影響を与えない1又は2以上のアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するアミノ酸配列を含む請求項3記載の遺伝子。
5. コリネ型L-グルタミン酸生産菌由来の $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターが連結されて得られる組換えDNA。
6. 請求項5記載の組換えDNAを保有するコリネ型細菌。
7. 請求項5記載の組換えDNAを保有し、かつL-リジン生産能を有するコリネ型細菌を液体培地に培養し、培養液中にL-リジンを生成蓄積させ、これを採取することを特徴とするL-リジンの製造法。

1 / 1

FIG. 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01131

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12P13/08, C12P13/14, C12N1/21, C12N15/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12P13/08, C12P13/14, C12N1/21, C12N15/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Mark G. DARLISON et al. "Nucleotide sequence of the sucA gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of Escherichia coli K12" Eur. J. Biochem. Vol. 141 (1984) P. 351-359	3-7/1,2
Y/A	Mark G. DARLISON et al. "Nucleotide sequence of the sucB gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of Escherichia coli K12 and homdagy with the corresponding acetyltransferase" Eur. J. Biochem. Vol. 141 (1984) P. 361-379	3-7/1,2
A	JP, 5-007491, A (Ajimonoto Co., Inc.), January 19, 1993 (19. 01. 93) & FR, 2667875, A	1
A	KIM I-J. et al. "Genetic regulation for the biosynthesis of glutamates in corynebacterium-glutamicum" Korean J. Appl Microbiol Bioeng Vol. 14, No. 5 (1986) P. 427-432	1 - 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 17, 1995 (17. 08. 95)

Date of mailing of the international search report

September 12, 1995 (12. 09. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01131

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Peter Carlsson et al. "Bacillus subtilis citM the structural gene for dihydrolipoamide transsuccinylase:cloning and expression in Escherichia coli" Gene Vol. 61 (1987) P. 217-224	3-6/1,2
A	JP, 5-244970, A (Ajinomoto Co., Inc.), September 24, 1993 (24. 09. 93) & US, 5378616, A	1, 2
A	Isamu Shiio et al. "Presence and regulation of $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, Brevibacterium flavum" Agric. Biol. Chem. Vol. 44, No. 8 (1980) P. 1897-1904	1, 2
A	Isamu Shiio et al. "Glutamate metabolism in a glutamate-producing bacterium Brevibacterium flavum" Agric. Biol. Chem. Vol. 46, No. 2 (1982) P. 493-500	1, 2
A	JP, 6-023779, A (Ajinomoto Co., Inc.), February 1, 1994 (01. 02. 94) (Family: none)	1, 2
A	Edited by Makoto Ishimoto "Metabolic map" (Kyoritsu Shuppan K.K.), July 25, 1971 (25. 07. 71) P. 37	7

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl.<sup>8</sup> C12P13/08, C12P13/14, C12N1/21, C12N15/53</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl.<sup>8</sup> C12P13/08, C12P13/14, C12N1/21, C12N15/53</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAS ON LINE, WPI, WPI/L, BIOSIS</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y/A</td> <td>Mark G. DARLISON et al. [Nucleotide sequence of the sucA gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of Escherichia coli K12] Eur. J. Biochem. 第141巻 (1984) P. 351-359</td> <td>3-7/1, 2</td> </tr> <tr> <td>Y/A</td> <td>Mark G. DARLISON et al. [Nucleotide sequence of the sucB gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of Escherichia coli K12 and homology with the</td> <td>3-7/1, 2</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y/A	Mark G. DARLISON et al. [Nucleotide sequence of the sucA gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of Escherichia coli K12] Eur. J. Biochem. 第141巻 (1984) P. 351-359	3-7/1, 2	Y/A	Mark G. DARLISON et al. [Nucleotide sequence of the sucB gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of Escherichia coli K12 and homology with the	3-7/1, 2
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
Y/A	Mark G. DARLISON et al. [Nucleotide sequence of the sucA gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of Escherichia coli K12] Eur. J. Biochem. 第141巻 (1984) P. 351-359	3-7/1, 2									
Y/A	Mark G. DARLISON et al. [Nucleotide sequence of the sucB gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of Escherichia coli K12 and homology with the	3-7/1, 2									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>17. 08. 95</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>12.09.95</p>									
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP)</p> <p>郵便番号100</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>種 村 慈 樹</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3449</p>									

## C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	corresponding acetyltransferase] Eur. J. Biochem. 第141巻(1984)P. 361-379	
A	JP,5-007491, A(味の素株式会社), 19. 1月 1993(19. 01. 93)&FR. 2667875, A	1
A	KIM I-J. et al.[Genetic regulation for the biosynthesis of glutamates in corynebacterium-glutamicum] Korean J. Appl Microbiol Bioeng 第14巻第5号(1986) P. 427-432	1-6
Y/A	Peter Carlsson et al.[Bacillus subtilis citM the structural gene for dihydrolipoamide transsuccinylase:cloning and expression in Escherichia coli] Gene 第61巻(1987)P. 217-224	3-6/1,2
A	JP,5-244970, A(味の素株式会社), 24. 9月 1993(24. 09. 93)&US. 5378616, A	1, 2
A	Isamu Shio et al. [Presence and regulation of $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, Brevibacterium flavum] Agric. Biol. Chem. 第44巻第8号(1980)P. 1897-1904	1, 2
A	Isamu Shio et al.[Glutamate metabolism in a glutamate-producing bacterium Brevibacterium flavum] Agric. Biol. Chem. 第46巻第2号(1982)P. 493-500	1, 2
A	JP,6-023779, A(味の素株式会社), 1. 2月 1994(01. 02. 94)(ファミリーなし)	1, 2
A	石本真 他編「メタボリックマップ」(共立出版株式会社), 25. 7月 1971(25. 07. 91)P. 37	7